526,061

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2004 年3 月11 日 (11.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/020632 A1

(51) 国際特許分類[7]: C12N 15/12, C12Q 1/68

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/011118

(22) 国際出願日: 2003 年8 月29 日 (29.08.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-252446 2002 年8 月30 日 (30.08.2002) JP
PCT/JP02-10018 2002 年9 月27 日 (27.09.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 ビー・エム・エル (BML, INC.) [JP/JP]; 〒151-0051 東京都 渋谷区 千駄ヶ谷5丁目21番3号 Tokyo (JP).

(71) 出願人 および
(72) 発明者: 近藤 直実 (KONDO,Naomi) [JP/JP]; 〒467-0821 愛知県 名古屋市瑞穂区 上坂町 1－3－1 Aichi (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 松井 永子 (MATSUI,Eiko) [JP/JP]; 〒502-0932 岐阜県 岐阜市 則武中 2－15－16 The TOM 305 Gifu (JP). 金子 英雄 (KANEKO,Hideo) [JP/JP]; 〒501-0435 岐阜県 本巣郡北方町 春来町 3－103 Gifu (JP). 青木 美奈子 (AOKI,Minako) [JP/JP]; 〒500-8041 岐阜県 岐阜市靭屋町 15－1 U-House ギフ8C Gifu (JP). 長尾 みづほ (NAGAO,Mizuho) [JP/JP]; 〒500-8801 岐阜県 岐阜市 忠節町 4－71－1 コスモ河村202 Gifu (JP). 笠原 貴美子 (KASAHARA,Kimiko) [JP/JP]; 〒501-6241 岐阜県 羽島市竹鼻町 昭和町 3045 Gifu (JP). 館林 宏治 (TATEBAYASHI,Hiroharu) [JP/JP]; 〒501-0223 岐阜県 瑞穂市 穂積 229－1 Gifu (JP). 服部 浩明 (HATTORI,Hiroaki) [JP/JP]; 〒350-1101 埼玉県 川越市 的場 1361番地 1 株式会社 ビー・エム・エル 総合研究所内 Saitama (JP). 江頭 徹 (EGASHIRA,Toru) [JP/JP]; 〒350-1101 埼玉県 川越市 的場 1361番地 1 株式会社 ビー・エム・エル 総合研究所内 Saitama (JP).

(74) 代理人: 志村 光春 (SHIMURA,Mitsuharu); 〒150-0031 東京都 渋谷区 桜丘町 9－3 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則4.17に規定する申立て:
— すべての指定国のための不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則4.17(v))
— すべての指定国のための不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則4.17(v))

添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD FOR THE DETECTION OF GENES SPECIFYING ALLERGEN

(54) 発明の名称: アレルギー素因を規定する遺伝子の検出方法

(57) Abstract: A method for the detection of genes whereby an allergen is detected by detecting gene polymorphisms in allergen-associated genes, i.e., interleukin 12 receptor IL-1β2 chain and β1 chain genes, interleukin 18 receptor α chain gene, interferon γ receptor 1 chain gene and interleukin 12-p40 subunit gene. Thus, it is possible to provide methods of preventing the onset of allergic diseases and contributing to the treatment of allergic diseases.

(57) 要約: アレルギーの素因に関連する遺伝子である、インターロイキン１２レセプターIL-1β２鎖およびβ１鎖遺伝子と、インターロイキン１８レセプターα鎖遺伝子と、インターフェロンγレセプター１鎖遺伝子と、インターロイキン１２・ｐ４０サブユニット遺伝子における遺伝子多型を検出することにより、アレルギーの素因を検出する、遺伝子の検出方法である。これにより、アレルギー性疾患の発症の予防や、アレルギー性疾患の治療に寄与する途が提供される。

WO 2004/020632 A1

明細書

アレルギー素因を規定する遺伝子の検出方法

技術分野

本発明は、ヒトの遺伝子の検出方法に関し、より具体的には、ヒトのアレルギー素因を検出するための指標となり得る遺伝子多型の検出方法に関する発明である。

背景技術

アレルギーは、アレルゲンの侵入により応答して生ずる、生体にとっては不利益な免疫反応の総称であり、その機序の違いにより、Ⅰ型からⅤ型までの、大きく５つに分類される。また、アトピー（異型の疾患の意味）とは、抗原と抗体による免疫反応のうち、IgE抗体が関与するⅠ型の反応を示す遺伝的な素質を意味する用語である。そして、このアトピーがかかわって発症する疾患が、アトピー性疾患である。アレルギー疾患の多くは、このアトピー性疾患であることが知られている。かかるアレルギー（アトピー）性疾患は、遺伝的な素因と、環境要因（アレルゲンの存在）によって発症するといわれている。

このように、アレルギー（アトピー）性疾患の発症要素として、アレルゲンは最も本質的なものであり、例えば、アトピー性喘息のアレルゲンは、ハウスダスト、ダニ、カンジダ等である場合が多く、アレルギー性鼻炎では、スギやブタクサの花粉である場合が多い。また、食物性アレルゲンとしては、鶏卵、ミルク、大豆等が挙げられる。

アレルギー（アトピー）性疾患の発症には、まず、生体に、アレルギー（アトピー）の素因が存在することが前提となり、その生体が、アレルゲンと接触することにより、様々な要因によって、アレルギー（アトピー）性疾患が発症する。例えば、上記のⅠ型アレルギーは、即時型アレルギーとして知られており、アレルゲンが、アレルギー（アトピー）

の素因を有する生体内に侵入することにより、IgE抗体が産生される。このIgE抗体はFceレセプターを介してマスト細胞や好塩基球上に結合する。ここにアレルゲンが結合することにより、２分子のIgE抗体が架橋し、その結果、細胞内顆粒に貯蔵されているヒスタミン、セロトニン、ヘパリン、アリルサルファターゼ、NCF（neutrophil chmotactic factor）、ECP（eosinophil cationic protein）などが脱顆粒により放出される。さらに、アラキドン酸から新たに産生されるロイコトリエンB_4、C_4、D_4、プロスタグランジンE_2、$F_2\alpha$、I_2、トロンボキサンA_2や、血小板活性化因子(PAF)などの化学伝達物質が放出される。これら放出されたヒスタミンやロイコトリエンなどの化学伝達物質は、好酸球、好中球、リンパ球、単球、マクロファージなどの炎症細胞を刺激し、平滑筋の収縮、血管透過性の亢進、粘液分泌亢進などを引き起こし、アレルギーが発症する。

このように、アレルギー（アトピー）性疾患の発症に際しては、まず、アレルギー（アトピー）の素因が必要であり、この素因を有する生体が、アレルゲンに感作されて免疫アレルギー反応が惹起され、さらに種々の要因が加わり、はじめてアレルギー（アトピー）性疾患が発症し、さらに増悪因子によっても影響されるものと考えられている。

上述したように、IgEは、アレルギーを規定する、最も基本的で、かつ、重要な蛋白質である。

本発明の目的は、このIgEの産生に関連する遺伝子とアレルギー（アトピー）の素因とを関連づける要素を見い出して、これを利用した、アレルギー（アトピー）の素因の解析手段を提供することで、アレルギー（アトピー）性疾患の発症の予防や、アレルギー（アトピー）性疾患の治療に寄与する途を提供することにある。

発明の開示

IgE産生はT細胞(TH2)より分泌されるインターロイキン４(IL-4)等が、B細胞を刺激することにより起こる。このように、IgEの産生は、IL-4を中心とする情報伝達により誘導され、活性化される。

一方、このIL-4によるB細胞からのIgE産生は、T細胞（TH1）より分泌されるインターフェロンγ(INF-γ)を中心とする情報伝達により制御され、INF-γ産生は、その情報伝達の上流で、さらにインターロイキン１２(IL-12)やインターロイキン１８(IL-18)等の、サイトカインによるT細胞への刺激により、その産生が誘導される。

このように、アレルギー反応の主役であるIgEの産生は、IL-4による産生誘導と、INF-γによる産生抑制とのバランスによってコントロールされており、このバランスが崩れることによって、IgEの産生のバランスも崩れることとなる。IgE産生促進系のシステムは、IL-4が、そのレセプターであるIL-4レセプター（IL-4R）に結合することによりIgE産生が促されるシステムであり、IgE産生抑制系のシステムは、IL-12 あるいはIL-18が、それぞれのレセプターであるIL-12レセプター（IL-12R）あるいはIL-18レセプター(IL-18R)に結合することによりINF-γが分泌され、IgE産生が抑制されるシステムである。

本発明者らは、このIgEの産生システムに関連する遺伝子について着目することで、目的とするアレルギー（アトピー）の素因を遺伝子レベルで特定できるのではないか、と考えた。

本発明者の一人は、アレルギー疾患においては、家族的、あるいは、遺伝的集積があると考えられていることから、患者のIgE産生量を測定し、その結果、両親のいずれかに血清IgE値が高値であるほど、発端者のIgEが高値である結果を得た（近藤直実、他. アトピー性皮膚炎とIL-12レセプター遺伝子変異. 臨床免疫36:535-540, 2001）。また、患者末梢血単核球（PBMCs）を分離し、マイトゲンあるいは抗原刺激により産生される、培養上清中のINF-γとIL-4量を測定したところ、IgE高値の患者においてIgE値と産生IL-4量は正相関を示すよりは、むしろ、INF-γと負の相関を示すことが明らかになった(Teramoto T. et al., Clin Exp Allergy, 28:74-82, 1998)。さらに、卵に過敏性のある患者では、オブアルブミン刺激後の、培養上清中のIL-4 量と血清IgE値に、有意な（$p<0.01$）正相関が認められ、INF-γ量と血清IgE値 においては、有意な（$p<0.05$）逆

相関が認められた（Kuwabara N, et al., J Investig Allergol Clin Immunol 5:198-204, 1995）。また、IL-4とポークウィードマイトゲンで刺激した、PBMCsのIgE産生が、リコンビナントINF-γにより抑制される（Kuwabara N, et al., J Investig Allergol Clin Immunol 5:198-204, 1995）ことから、INF-γが、IL-4により誘導されるIgE産生を抑制していることと、INF-γの産生が低下していると、IgE産生が亢進することが示唆された。さらに、INF-γのmRNAを定量したところ、INF-γの産生量は、INF-γのmRNA量と強い正相関（r=0.947, n=8）を示すことから、上記INF-γの産生低下は、INF-γのmRNA発現低下によることが明らかになった（Teramoto T. et al., Clin Exp Allergy, 28:74-82, 1998）。

このような研究成果を基に、アレルギーのIgE産生過剰におけるINF-γ産生不全と考えられる病態に関して、さらに情報伝達の上位でINF-γの産生誘導するIL-12とIL-18について検討した。IL-12は、分子サイズ75kDで、35kD（p35）と40kD（p40）のサブユニットとからなるヘテロダイマーの蛋白質である。IL-12レセプター（IL-12R）は、β1鎖とβ2鎖からなり、β2鎖は細胞内ドメインに3ケ所のチロシン残基を有する。IL-12Rは、IL-12のシグナルカスケードの初発ステップである。患者由来PBMCsを、IL-12、あるいは、IL-18で刺激した際の培養上清中のINF-γ産生量を測定した結果、両者それぞれの刺激で産生されるINF-γ産生量は、正相関を示した。しかしながら、両者の刺激によるINF-γ産生に乖離する症例が認められた。

このような結果は、PBMCsを、IL-12刺激、フィトヘマアグラチニン（PHA）刺激した際のINF-γ産生量にも同様に認められた。これらのINF-γ産生量に乖離が認められた症例について、それぞれのレセプターを含む情報伝達系の異常を検索した。

このような結果に基づき、遺伝子解析を行った結果、アレルギー（アトピー）の素因に関連する、複数の遺伝子多型が認められた（後述する）。

これらの遺伝子多型は、IgEの産生バランスに深く関わっており、これらの遺伝子多型についての解析を行うことにより、被験者のアレルギー

（アトピー）の素因を検出することが可能であることを、本発明者は見い出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、後述する１～13で示される遺伝子多型からなる群から選ばれる１種以上の遺伝子多型を検出することにより、被験者のアレルギー素因を検出する、遺伝子の検出方法（以下、本遺伝子検出方法ともいう）を提供する発明である。

なお、「遺伝子多型」とは、遺伝子が、その塩基配列において、個体毎に異なる特異的な部位を保有していることを意味する。遺伝子多型は、第１に、特定の遺伝子のコーディング領域の多型で、当該コーディング領域によりコードされるアミノ酸残基の多型として規定される多型を含む。このタイプの多型には、ゲノムＤＮＡにおいては認められず、ゲノムＤＮＡから、ｍＲＮＡ前駆体を経て、ｍＲＮＡになる過程（主に、ｍＲＮＡ前駆体のスプライシングの過程）で生ずる多型（この多型は、主にｃＤＮＡにおける多型として特定され得る）も、含まれる。また、第２に、遺伝子多型には、特定の遺伝子の非コーディング領域（典型的には、プロモーター領域、イントロン領域等）の塩基における多型も含まれる。この場合の多型は、主に、ゲノムＤＮＡにおいて規定される多型である。遺伝子多型は、その遺伝子の多型頻度、そのｍＲＮＡの発現量、蛋白発現量、あるいは蛋白の機能等の多角的な解析により、同定される。

また、本明細書において、「野生型」とは、遺伝子多型が認められる塩基またはアミノ酸残基において、具体的には、データベース等において公開されている遺伝子の塩基配列に基づく塩基またはアミノ酸残基である。また、多型塩基または多型アミノ酸残基とは、多型が認められる塩基またはアミノ酸残基における、野生型の塩基またはアミノ酸残基以外の塩基またはアミノ酸残基である。

また、「遺伝子多型の検出」とは、被験者の検体において、遺伝子多型が認められる塩基またはアミノ酸残基が、野生型塩基またはアミノ酸残基であるか、あるいは、多型塩基またはアミノ酸残基塩基であるかを検出することを意味することとする。

ところで、本明細書におけるアミノ酸の表記方法は、三文字法及び一文字法による。念のために、かかる表記内容をここに記載する。

『アラニン〔Ａｌａ（三文字法、以下同様）、Ａ（一文字法、以下同様）〕バリン〔Ｖａｌ、Ｖ〕、ロイシン〔Ｌｅｕ、Ｌ〕、イソロイシン〔Ｉｌｅ、Ｉ〕、プロリン〔Ｐｒｏ、Ｐ〕、フェニルアラニン〔Ｐｈｅ、Ｆ〕、トリプトファン〔Ｔｒｐ、Ｗ〕、メチオニン〔Ｍｅｔ、Ｍ〕、グリシン〔Ｇｌｙ、Ｇ〕、セリン〔Ｓｅｒ　Ｓ〕、スレオニン〔Ｔｈｒ、Ｔ〕、システイン〔Ｃｙｓ、Ｃ〕、グルタミン〔Ｇｌｎ、Ｑ〕、アスパラギン〔Ａｓｎ、Ｎ〕、チロシン〔Ｔｙｒ、Ｙ〕、リジン〔Ｌｙｓ、Ｋ〕、アルギニン〔Ａｒｇ、Ｒ〕、ヒスチジン〔Ｈｉｓ、Ｈ〕、アスパラギン酸〔Ａｓｐ、Ｄ〕、グルタミン酸〔Ｇｌｕ、Ｅ〕』

また、本明細書中のアミノ酸残基についての表記で、例えば、「Ａ１００Ｖ」とは、「対象となるペプチドのアミノ酸配列における１００番目の、野生型のアミノ酸残基であるアラニンと、多型アミノ酸残基であるバリンにより規定される、遺伝子多型」を示すこととする。

また、同じく本明細書中の遺伝子の塩基配列についての表記で、例えば、「１０００Ｃ／Ｔ」とは、「対象となる遺伝子の塩基配列における１０００番目の、野生型の塩基であるシトシンと、多型塩基であるチミンにより規定される、遺伝子多型」を示すこととする。

また、後述する１～９において表される遺伝子多型を特定する基となる、野生型の遺伝子配列における配列表記は、特に断らない限り、全て、ｃＤＮＡの塩基配列番号である。よって、１～９の遺伝子多型は、全て、少なくともｃＤＮＡにおいて認められる多型であるが、かかるｃＤＮＡの多型に対応するゲノムＤＮＡにおける多型や、ｍＲＮＡにおける多型、に基づくアレルギー素因の検出にかかわる遺伝子の検出方法も、本遺伝子検出方法の技術的範囲に包含されるものである。

さらに、後述する１０～１３において表される遺伝子多型を特定する基となる、野生型の遺伝子配列における配列表記は、インターロイキン１２・ｐ４０サブユニット遺伝子の配列として、公開データベースにお

いて登録されている配列（Gene Bank Accession Number：AY008847）に基づいて行うこととする。

図面の簡単な説明

第１図は、インベーダー・アッセイ法のあらましを略図化した図面である。

第２図は、遺伝子多型１にかかわる、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容を示した図面である。

第３図は、遺伝子多型２にかかわる、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容を示した図面である。

第４図は、遺伝子多型３にかかわる、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容を示した図面である。

第５図は、遺伝子多型４にかかわる、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容を示した図面である。

第６図は、遺伝子多型１～４にかかわる被験者の、培養末梢血単核球が分泌したIgE量を示す図面である。

第７図は、遺伝子多型５にかかわる、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容を示した図面である。

第８図は、遺伝子多型６にかかわる、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容を示した図面である。

第９図は、遺伝子多型７にかかわる、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容を示した図面である。

第１０図は、遺伝子多型８にかかわる、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容を示した図面である。

第１１図は、遺伝子多型８にかかわる、培養末梢血単核球が分泌したIgE量を示す図面である。

第１２図は、遺伝子多型９にかかわる、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容を示した図面である。

第１３図は、遺伝子多型９が認められる被験者の家系解析の結果を示

す図面である。

第１４図は、遺伝子多型１０と１１が存在する部分を、その近傍の塩基配列と共に示した図面である。

第１５図は、遺伝子多型１２が存在する部分を、その近傍の塩基配列と共に示した図面である。

第１６図は、遺伝子多型１３が存在する部分を、その近傍の塩基配列と共に示した図面である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態について説明する。

上述したように、本発明は、アレルギー（アトピー）の素因に関連する遺伝子である、インターロイキン１２レセプター（IL-12R）β２鎖およびβ１鎖遺伝子と、インターロイキン１８レセプター（IL-18R）α鎖遺伝子と、インターフェロンγレセプター（INFγR）１鎖遺伝子と、インターロイキン１２（IL-12）・ｐ４０サブユニット遺伝子における遺伝子多型を検出することで、アレルギー（アトピー）の素因を検出する、遺伝子多型の検出方法である。

IL-12Rβ２鎖遺伝子と、これがコードするIL-12Rβ２鎖蛋白質については、すでに解析がなされている（Presky D, et al., Proc Natl Acad Sci, 93:14002-14007, 1996）。このIL-12Rβ２鎖遺伝子のｃＤＮＡの塩基配列と、それに対応するアミノ酸配列は、配列番号１に示した（Gene Bank Accession Number:U64198）。IL-12Rβ１鎖遺伝子と、これがコードするIL-12Rβ１鎖蛋白質についても解析がなされている(Chua A, et al., J Immun, 153:128-136, 1994)。このIL-12Rβ１鎖遺伝子のｃＤＮＡの塩基配列と、それに対応するアミノ酸配列は、配列番号２に示した（Gene Bank Accession Number:U03187）。また、INFγR１鎖遺伝子と、これがコードするINFγR１鎖蛋白質については、すでに解析がなされている(Aguet M, Cell, 55:273-280, 1988)。このINFγR１鎖遺伝子のｃＤＮＡの塩基配列と、それに対応するアミノ酸配列は、配列番号３に示した（Gene Bank

Accession Number:J03143）。また、IL-18Rα鎖遺伝子と、これがコードするIL-18Rα鎖蛋白質については、すでに解析がなされている（Parnet P, J Biol Chem, 271:3967-3970, 1996）。このIL-18Rα鎖遺伝子ｃＤＮＡの塩基配列と、それに対応するアミノ酸配列は、配列番号４に示した（Gene Bank Accession Number:U43672）。また、上述のように、IL-12・p40サブユニット遺伝子のゲノムＤＮＡの塩基配列は、すでに解析がなされている（Gene Bank Accession Number：AY008847）。

特定の遺伝子の多型と、これらの多型遺伝子がコードして産生される多型蛋白質により惹起されると考えられる現象、すなわち、種々のアレルギー性疾患（例えば、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物アレルギー等）との関係を具体的に解析することにより、本遺伝子検出方法において利用し得る、IL-12Rβ２鎖遺伝子と、IL-12Rβ１鎖遺伝子と、IL-18Rα鎖遺伝子と、INFγＲ１鎖遺伝子と、IL-12・p40サブユニット遺伝子における遺伝子多型を見い出すことができる。すなわち、アレルギー（アトピー）性疾患と健常人等の組み合わせにおいて、IL-12Rβ２鎖遺伝子と、IL-12Rβ１鎖遺伝子と、IL-18Rα鎖遺伝子と、INFγＲ１鎖遺伝子と、IL-12・p40サブユニット遺伝子の多型部位と多型頻度、あるいは、その多型により生ずる蛋白の機能を解析することにより、所望する遺伝子多型を見出すことができる。かかる作業の実際については、後述する実施例において、具体的に記載する。

本発明者は、前述したように、現在までに、IL-12Rβ２鎖遺伝子と、IL-12Rβ１鎖遺伝子と、IL-18Rα鎖遺伝子と、INFγＲ１鎖遺伝子と、IL-12・p40サブユニット遺伝子において見い出され、アレルギー素因と関連が認められる遺伝子多型として、

１．IL-12Rβ２鎖遺伝子によってコードされるIL-12Rβ２鎖蛋白質の３１３番目のアルギニンをコードする部位の遺伝子多型[例えば、IL-12Rβ２鎖遺伝子の９３７番目の塩基がアデニンまたはグアニン(多型塩基)であることにより、上記の３１３番目の多型アミノ酸残基がグリシンとして規定される遺伝子多型等]。

２．IL-12Rβ２鎖遺伝子によってコードされるIL-12Rβ２鎖蛋白質の６０４番目のアラニンをコードする部位の遺伝子多型[例えば、IL-12Rβ２鎖遺伝子の１８１１番目の塩基がシトシンまたはチミン(多型塩基)であることにより、上記の６０４番目の多型アミノ酸残基がバリンとして規定される遺伝子多型等]。

３．IL-12Rβ２鎖遺伝子によってコードされるIL-12Rβ２鎖蛋白質の６１９番目のグリシン以降のアミノ酸をコードする部位が欠失するか否かで規定される遺伝子多型（例えば、IL-12Rβ２鎖遺伝子の１８５６～１９４６番目の塩基が欠失するか否かにより規定される遺伝子多型等）

４．IL-12Rβ２鎖遺伝子によってコードされるIL-12Rβ２鎖蛋白質の７２０番目のヒスチジンをコードする部位の遺伝子多型[例えば、IL-12Rβ２鎖遺伝子の２１５９番目の塩基がアデニンまたはグアニン(多型塩基)であることにより、上記の７２０番目の多型アミノ酸残基がアルギニンとして規定される遺伝子多型等]。

５．IL-12Rβ１鎖遺伝子によってコードされるIL-12Rβ１鎖蛋白質の３６１番目のアルギニンをコードする部位の遺伝子多型[例えば、IL-12Rβ１鎖遺伝子の１０８１番目の塩基がシトシンまたはチミン(多型塩基)であることにより、上記の３６１番目の多型アミノ酸残基がトリプトファンとして規定される遺伝子多型等]。

６．IL-12Rβ１鎖遺伝子によってコードされるIL-12Rβ１鎖蛋白質の３６５番目のメチオニンをコードする部位の遺伝子多型[例えば、IL-12Rβ１鎖遺伝子の１０９４番目の塩基がチミンまたはシトシン(多型塩基)であることにより、上記の３６５番目の多型アミノ酸残基がスレオニンとして規定される遺伝子多型等]。

７．IL-12Rβ１鎖遺伝子によってコードされるIL-12Rβ１鎖蛋白質の３７８番目のグリシンをコードする部位の遺伝子多型[例えば、IL-12Rβ１鎖遺伝子の１１３２番目の塩基がグアニンまたはシトシン(多型塩基)であることにより、上記の３７８番目の多型アミノ酸残基がアルギニンとして規定される遺伝子多型等]。

8．IL-18Rα鎖遺伝子によってコードされるIL-18Rα鎖蛋白質の３１７番目のアラニンが欠失しているか否かで規定される遺伝子多型（例えば、IL-18Rα鎖遺伝子の９５０～９５２番目の塩基が欠失するか否かにより規定される遺伝子多型等）。

9．INF-γＲ１鎖遺伝子によってコードされるINF-γＲ１鎖蛋白質の４６７番目のロイシンをコードする部位の遺伝子多型[例えば、INF-γＲ１鎖遺伝子の１４００番目の塩基がチミンまたはシトシン（多型塩基）であることにより、上記の４６７番目の多型アミノ酸残基がプロリンとして規定される遺伝子多型等]。

10．IL-12・p40サブユニット遺伝子のイントロン１の３６９６番目のグアニンと他塩基との置換として規定される遺伝子多型(例えば、当該３６９６番目の多型塩基がアデニンである遺伝子多型等)。

11．IL-12・p40サブユニット遺伝子のイントロン１の３７５７番目のシトシンと他塩基との置換として規定される遺伝子多型(例えば、当該３７５７番目の多型塩基がチミンである遺伝子多型等)。

12．IL-12・p40サブユニット遺伝子のイントロン４の１２３５９番目のチミンと他塩基との置換として規定される遺伝子多型(例えば、当該１２３５９番目の多型塩基がグアニンである遺伝子多型等)。

13．IL-12・p40サブユニット遺伝子のイントロン６の１６０７８番目のシトシンと他塩基との置換として規定される遺伝子多型(例えば、当該１６０７８番目の多型塩基がチミンである遺伝子多型等)。

が挙げられる。

なお、後述するように、IL-12・p40サブユニット遺伝子のイントロン１における上記10と11の遺伝子多型は、互いに連鎖平行の関係にあり、本遺伝子検出方法を、当該イントロン１に対して行うに際して、上記10と11の遺伝子多型のいずれかを検出することが効率的である。また、同様に、IL-12・p40サブユニット遺伝子のイントロン４における上記12と、イントロン６における上記13の遺伝子多型は、互いに平行連鎖の関係にあり、本遺伝子検出方法を、当該イントロン４または６に対して行うに

際して、上記12と13の遺伝子多型のいずれかを検出することが効率的である。

遺伝子多型部位における遺伝子多型の検出方法としては、通常公知の方法、例えば、サザンブロット法を用いたＲＦＬＰ法や、ＰＣＲ－ＲＦＬＰ法、ＨＥＴ(hetero duplex analysis)法、ＤＧＧＥ法(denaturing gradient gel electrophoresis) 法、ＤＳ(direct sequence) 法、ＣＣＭ(chemical cleavage mismatch)法、ＣＤＩ(carbodiimid modification)法、さらにはＰＣＲ法を用いた一本鎖ＤＮＡ高次構造多型解析法〔ＰＣＲ－ＳＳＣＰ(single-stranded conformation polymorphism)法、以下、本明細書においてはＳＳＣＰ法という〕、ＰＣＲ/ ＧＣ－clamp 法、インベーダー・アッセイ法〔Third Wave Technologies 社（米国）〕等を用いることができる〔例えば、バイオマニュアルシリーズ１，遺伝子工学の基礎技術，山本　雅編，羊土社（1993）等を参照のこと、特に、ＰＣＲ/ ＧＣ－clamp 法については、Myers, R.M., Shefield, V., and Cox, D.R.(1988) in Genomic Analysis:A Practical Approach. K. Davies, ed. IRL Press Limited, Oxford, pp. 95-139 等を参照のこと〕が、簡便かつ正確に遺伝子多型を特定し得るという点において、インベーダー・アッセイ法を選択することが好ましい。

第１図は、このインベーダー・アッセイ法のあらましを略図化した図面である。

第１図において、鋳型ヌクレオチド鎖１１［野生型遺伝子（ゲノムＤＮＡの塩基配列であっても、ｃＤＮＡの塩基配列であってもよい）］に対して、まず、第１のヌクレオチド鎖１２をハイブリダイズさせる。

第１のヌクレオチド鎖１２は、鋳型ヌクレオチド鎖１１における、多型検出対象塩基〔本図では、野生型がＴ（チミン）〕に相補的な塩基〔本図では、Ａ（アデニン）〕が３’末端に位置する、鋳型ヌクレオチド鎖１１に対して相補的なヌクレオチド鎖である（なお、この例では、第１のヌクレオチド鎖１２の３’末端の塩基は、多型検出対象塩基に対して相補的であるが、たとえ相補的塩基ではなくても、その塩基が、多型検

出対象塩基と第２のヌクレオチド鎖の会合反応に干渉することにより、部分的三重鎖構造が形成され得る）。

次いで、この鋳型ヌクレオチド鎖１１と第１のヌクレオチド鎖１２との部分的２本鎖に対して、さらに、第２のヌクレオチド鎖１３をハイブリダイズさせる。

第２のヌクレオチド鎖１３は、鋳型ヌクレオチド鎖１１に対して相補的な「相補的部分」１３１が、３’側にあり、これと連続して、検出要素が設けられた、鋳型ヌクレオチド鎖に対して非相補的な「検出用部分」１３２が、５’側にある、複合的ヌクレオチド鎖であり、「相補的部分」１３１の最も５’側の塩基は、多型検出対象塩基（Ｔ）に対して相補的な塩基（Ａ）となっている。

この第２のハイブリダイズ反応によって、鋳型ヌクレオチド鎖１１の多型検出対象塩基部分（Ｔ）は、第１のヌクレオチド鎖１２の３’末端塩基と、第２のヌクレオチド鎖の「相補的部分」１３１の最も５’側の塩基（Ａ）との、部分的三重鎖構造が形成されることとなる。

次いで、この部分的三重鎖構造を、その３’側で特異的に切断する活性を有するヌクレアーゼ１４を作用させて、このヌクレアーゼにより切断された、第２のヌクレオチド鎖１３の検出用部分１３２’〔３’末端が、多型検出対象塩基（Ｔ）に対して相補的塩基（Ａ）となっている〕を検出することにより、鋳型ヌクレオチド鎖１１が、野生型であることを検出することができる。

本図においては、５’末端近傍に蛍光色素１５１とその３’側の近傍に蛍光消光物質（クエンチャー）１５２を標識した、ヘアピン型プローブ（ヌクレオチド鎖）１５を、上記のハイブリダイズ系と共存させることにより、上記の野生型の検出が可能である。

ヘアピン型プローブ１５の３’側の一本鎖部分は、第２のヌクレオチド鎖１３の検出用部分１３２に対して相補的に設計されており、かつ、かかる一本鎖部分の最も５’側の塩基に隣合うさらに５’側の一塩基は、多型検出対象塩基（Ｔ）となっている。そして、検出用部分１３２’が、

ヘアピン型プローブ１５の一本鎖部分とハイブリダイズすると、検出用部分１３２’の3’末端の塩基（Ａ）が、ヘアピン型プローブ１５の二本鎖部分の先端において、再び、部分的三重鎖構造を形成する。これに対し、再度、ヌクレアーゼ１４が作用して、ヘアピン型プローブ１５における、蛍光色素１５１と蛍光消光物質１５２の間が切断され、蛍光色素１５１が遊離し、蛍光消光物質１５２による蛍光消光作用から開放されて、本来の蛍光が検出可能な状態となる。この蛍光を検出することにより、鋳型ヌクレオチド鎖１１が、多型検出対象塩基において多型塩基が認められない野生型遺伝子であることを検出することができる。

これに対して、鋳型ヌクレオチド１１の多型検出対象塩基が、野生型の塩基（Ｔ）ではなく、例えば、Ｇ（グアニン）であるＳＮＰ塩基であり、これをポジティブに検出する場合には、第１のヌクレオチド鎖１２と第２のヌクレオチド鎖１３における、相補的塩基を、上記のＡから、Ｇに相補的なＣ（シトシン）として、さらに、ヘアピン型プローブ１５における蛍光色素１５１と蛍光消光物質１５２を、上記の系とは異なる蛍光を発色する蛍光色素と、これに対する蛍光消光物質とすることにより、鋳型ヌクレオチド鎖１１におけるＳＮＰｓを、異なる蛍光色素の蛍光によって検出することが可能である。

また、鋳型ヌクレオチド１１が、野生型塩基と多型塩基を有するものが、混在する場合（ヘテロ型）は、上記の２種類の蛍光の混合型蛍光として、ポジティブに検出することも可能である。

なお、ここには、ヘアピン型プローブを用いた検出システムを例示したが、これ以外にも、例えば、検出用部分１３２に、直接、蛍光標識やアイソトープ標識を行って、直接、検出用部分を検出することにより、遺伝子多型を検出することも可能である。さらに、ここでは、多型塩基を有する場合も、そうでない場合も、ポジティブに検出する例を示したが、いずれかの場合においては、蛍光等の標識が検出されない、ネガティブな検出を行うことも可能である。

上述したインベーダー・アッセイ法は、技術的には、反応の進行に伴

い、部分的三重鎖構造を特異的に切断するヌクレアーゼが、第２のヌクレオチド鎖の「検出用部分」を切り出す段階において（ヘアピン型プローブを用いる場合には、標識された蛍光物質を蛍光消光物質と切り離す段階においても）、連続的に働くため、蛍光等の、インベーダー・アッセイ法において用いる標識が増感される、極めて鋭敏な液相反応である。

ＰＣＲ/ ＧＣ－clamp 法は、ＤＧＧＥ法（ＤＮＡ変性剤の直線的な濃度勾配をつけたポリアクリルアミドゲルにおける、塩基置換を含む二本鎖ＤＮＡ断片と含まない二本鎖ＤＮＡ断片の、ＤＮＡを変性させるべきＤＮＡ変性剤濃度の相違に基づく移動度の差異を利用して、ＤＮＡの塩基置換を検出する方法）の変法であり、ＤＧＧＥ法における、「複数の塩基置換がある場合に、ポリアクリルアミドゲルにおいて、最後に融解するドメインの塩基置換を検出することができない」という欠点を、ＧＣ含量の高い領域（ＧＣ－clamp ）を、塩基置換の検出対象であるＤＮＡ断片につなげることにより克服した方法である〔Shefield,V.C. et al. (1989) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:232-236等を参照のこと〕。

よって、ＰＣＲ/ ＧＣ－clamp 法の基本的操作等は、ＤＧＧＥ法に準ずるが、塩基置換検出の対象となるＤＮＡ断片に、ＧＣ－clamp を付加する工程が必要となる。

本遺伝子検出方法における、IL-12Rβ２鎖遺伝子と、IL-12Rβ１鎖遺伝子と、IL-18Rα鎖遺伝子と、INFγR１鎖遺伝子と、IL-12・p40サブユニット遺伝子の多型の検出の対象となるＤＮＡの出所は、特に限定されるべきものではなく、被験者の体細胞であれば、特に限定されない。例えば、末梢血や白血球等の血液検体を、本発明において好適に選択することができる。

すなわち、被験者の検体細胞（分離後、培養したものを用いることもできる）から、公知の方法を用いてゲノムＤＮＡを抽出し、このゲノムＤＮＡにおいて、特定の遺伝子部位における遺伝子多型（具体的には、特定の遺伝子部位における塩基の置換、欠失、挿入等）を検出することができる。また、被験者の検体細胞（分離後、培養したものを用いるこ

ともできる）から、公知の方法を用いて、ｍＲＮＡを抽出し、このｍＲＮＡを鋳型として得られるｃＤＮＡにおける多型を検出することも可能である。

そして、この検出作業の結果、上述した特定の遺伝子部位に多型塩基が認められた場合、この遺伝子部位の変化と、アレルギー（アトピー）の素因と関連付けて、被験者が発症する蓋然性の高いアレルギー（アトピー）疾患の種類や、現に発症しているアレルギー（アトピー）疾患の原因を特定することができる。

本遺伝子検出方法を行う態様は、特に限定されず、選択する遺伝子多型の検出方法に応じて適宜選択することができる。典型的には、本遺伝子検出方法を行うための要素が備わっている、遺伝子多型検出用キットを用いて行うことが可能である。具体的には、例えば、ウエルが設けられているマイクロプレートの個々のウエルに、本遺伝子検出方法を行うために必要な材料や試薬を組み合わせて、遺伝子多型の検出反応を行い、かかる検出反応により、所望する遺伝子多型を検出することができる。また、マイクロプレートに代えて、いわゆるマイクロアレイを用いて、遺伝子多型の検出を、さらに集約的に行うことも可能である。このように、この遺伝子多型検出用キットは、マイクロプレートやマイクロアレイ等の遺伝子検出を行う器具、試薬、希釈液等を、必要に応じて組み合わせて、その構成要素とすることができる。

本遺伝子検出方法を行うことによって、例えば、特定の遺伝子部位に多型塩基またはアミノ酸残基が認められる場合には、被験者において、アレルギー（アトピー）の素因が認められ、現時点で、被験者に異常がなくても、アレルギー（アトピー）疾患を発症するリスクが高いことを明らかにすることができる。このような場合、環境因子対策（例えば、ハウスダスト対策や、非アレルゲン食物の摂取等）を行うことによって、アレルギー（アトピー）疾患の発症を予防することが可能である。

また、例えば、既に、アレルギー（アトピー）疾患を発症している被験者に対して、本遺伝子検出方法を行うことにより、その疾患に対する

原因を遺伝子レベルで、高い確度で推定することが可能である。このような場合、特定された遺伝子異常に対応した治療方法を選択することにより、より効果的なアレルギー（アトピー）疾患の治療を行うことができる。

さらに、原因遺伝子異常がアレルギー（アトピー）疾患を惹起するメカニズムを明らかにすることにより、かかるメカニズムに対応した、アレルギー(アトピー)の治療薬の開発の途を提供することも可能である。

実施例

以下、実施例により、本発明を、さらに具体的に説明するが、これにより、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

[遺伝子の解析法]

末梢血単核球の分離および培養

末梢血単核球は静脈より血液を5 mlヘパリン採血し、ヘパリン血をFicoll（シグマ社製）に重層し、比重遠心により分離した。分離した単核球は１０％ウシ胎児血清、2 mmol/l L-グルタミン、100 U/mlペニシリン、および100 U/mlストレプトマイシン含有RPMI1640培地にて細胞数1 x 10^6個/mlの濃度にして、５％CO_2存在下で培養した。単核球の刺激は、10 μg/mlフィトヘマアグラチニン（PHA、Gibco BRL社製）、あるいは5 IU/ml IL-12（R&D社製）、あるいは400 IU/ml IL-18（MLB社製）を培地に添加し、行なった。

サイトカインの定量

刺激した単核球は、２４時間培養後、回収し、遠心により細胞画分を取り除き、培養上清を得た。得られた培養上清中のINF-γ量は、ELISAキット（大塚アッセイ社製）を用いて測定した。

RNA抽出およびRT-PCR

RNAは、２４時間PHA刺激した培養単核球を回収し、Isogenキット（日本ジーン社製）を用いて抽出し、さらに、これを用いて、常法により、ｃＤＮＡの合成を行った。IL-12Rβ1鎖、IL-12Rβ2鎖、IL-18Rα鎖、お

およびINF-γR1鎖の、それぞれのｃＤＮＡのRT-PCR増幅は、それぞれ、特異的なプライマーセット（下記第１表）を、用いて行なった。PCR反応は94℃で1分間、54℃で1分間、72℃で1分間のサイクルで、４０サイクル行なった。

第　１　表

配列	レセプター	プライマーシーケンス
1	IL-12Rβ1鎖	5'-CTCCTCGAACCAATTTGGTC-3'
2	IL-12Rβ1鎖	5'-CTGCACTTCGATGCTGAAGC-3'
3	IL-12Rβ2鎖	5'-CGGAGTTCTATACCAGAGTTG-3'
4	IL-12Rβ2鎖	5'-ACATCTAACATCCCAGTAGGC-3'
5	IL-12Rβ2鎖	5'-GATGACAGCTCTGACAGCTG-3'
6	IL-12Rβ2鎖	5'-GGCCTGATGACCTTGGATT-3'
7	IL-18Rα鎖	5'-CTGCTCTGCTTTGCTGAATG-3'
8	IL-18Rα鎖	5'-TCCTCTTGTGAAGACGTGGC-3'
9	INF-γR1鎖	5'-CGTCATACCAGCCATTTTCC-3'
１０	INF-γR1鎖	5'-TTGGTGCAACTTAGCTGATC-3'

配列１～１０は、それぞれ、後述する配列表の配列番号５～１４に対応する。

塩基配列の決定

それぞれのPCR産物はT-vector（Novagen社製）に組み込み、組み込まれたベクターを大腸菌（ＪＭ１０９株）に導入し、導入大腸菌株をクローニングした。クローニングした大腸菌よりプラスミドを抽出し、ダイレクトシーケンス等により、フラグメントの塩基配列を決定した。

ゲノムＤＮＡの抽出とＰＣＲ

ゲノムＤＮＡは、末梢血リンパ球より、常法に従って抽出した。このゲノムＤＮＡを鋳型として、第２表に示した配列のＰＣＲプライマーを

用いて、IL-12・p40サブユニット遺伝子のイントロン１と、イントロン４と、イントロン６の領域を、上述したＲＴ-ＰＣＲと同様の条件で増幅し、ダイレクトシーケンスにより、フラグメントの塩基配列を確認した。

第　２　表

配列	イントロン	プライマーシーケンス
１１	IL-12p40イントロン１	5'-GGCTTAAAGGGGCCAAGT-3'
１２	IL-12p40イントロン１	5'-AGGGAGCACTATCCCTCAGC-3'
１３	IL-12p40イントロン４	5'-GTCCAGAGACATGTAAGTGC-3'
１４	IL-12p40イントロン４	5'-GAGATGATGCTTGTCAACCA-3'
１５	IL-12p40イントロン６	5'-GCTAGAAAGATGAAAGCTGG-3'
１６	IL-12p40イントロン６	5'-GTTTCTGATTCTGGCAACTG-3'

配列１１～１６は、それぞれ、後述する配列表の配列番号１５～２０に対応する。

［臨床における解析］

アレルギー（アトピー）疾患の患者７５名（以下、アレルギー（アトピー）疾患の患者の抽出集団を「アレルギー群」ともいう）について、非アレルギー（アトピー）疾患の健常者６２名（以下、非アレルギー（アトピー）疾患の健常者の抽出集団を「非アレルギー群」ともいう）を対照として、末梢血単核球を分離し、IL-12、あるいはPHA刺激したときのINF-γ産生量を測定した。

PHA刺激によるINF-γ産生量は、非アレルギー群において116～10338 pg/ml（平均2886 pg/ml）であるのに対し、アレルギー群においては、46～10000 pg/ml（平均1324 pg/ml）と低下していた。また、IL-12刺激におけるINF-γ産生量は、非アレルギー群が、55～10000 pg/ml（平均971 pg/ml）、アレルギー群が、検出限界以下から1130 pg/ml（平均145 pg/ml）と有意に低下が認められた。アレルギー（アトピー）疾患の患者７５名のうち、２４名は、IL-12刺激によるINF-γ産生量が、検出限界以下であ

った。このINF-γ産生量が、検出限界以下を呈したアレルギー（アトピー）疾患例について、IL-12Rβ2鎖の遺伝子を検索した。その結果、下記の遺伝子多型が特定された。

遺伝子多型１（第２図参照）

第２図に示す、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容からわかるように、この遺伝子多型は、IL-12Rβ2鎖遺伝子の937番目の野生型塩基Aが、Gに置換しており、この塩基置換により、IL-12Rβ2鎖蛋白質の313番目の野生型アミノ酸残基Arg（AGA）が、Gly（GGA）に置換する多型であった（R313G多型）。

後述するように、この例のような、IL-12Rβ２鎖遺伝子によってコードされるIL-12Rβ２鎖蛋白質の３１３番目のArgをコードする部位の多型は、被験者のアレルギー素因と関連する遺伝子多型であることが明らかになった。

遺伝子多型２（第３図参照）

第３図に示す、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容からわかるように、この遺伝子多型は、IL-12Rβ2鎖遺伝子の1811番目の野生型塩基Cが、Tに置換しており、この塩基置換により、IL-12Rβ2鎖蛋白質の604番目の野生型アミノ酸残基Ala（GCT）が、Val（GTT）に置換する多型であった（A604V多型）。

後述するように、この例のような、IL-12Rβ２鎖遺伝子によってコードされるIL-12Rβ２鎖蛋白質の６０４番目のAlaをコードする部位の多型は、被験者のアレルギー素因と関連する遺伝子多型であることが明らかになった。

遺伝子多型３（第４図参照）

第４図に示す、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容からわかるように、この遺伝子多型は、野生型IL-12Rβ2鎖遺伝子の1856番目から1946番目の91塩基が欠失することによるフレームシフトにより、欠失部位下流45番目のアミノ酸残基が、ストップコドン（TAG）に置換することにより規定されるものであった。この91塩基の欠失により、アミノ酸

残基６２３個の異常なIL-12Rβ2鎖蛋白質が産生されることが予想される（1856del91多型）。

後述するように、この例のような、IL-12Rβ２鎖遺伝子によってコードされるIL-12Rβ２鎖蛋白質の６１９番目のグリシン以降のアミノ酸残基の欠失により規定される多型は、被験者のアレルギー素因と関連する遺伝子多型であることが明らかになった。

遺伝子多型４（第５図参照）

第５図に示す、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容からわかるように、この遺伝子多型は、IL-12Rβ2鎖遺伝子の2159番目の野生型塩基Aが、Gに置換しており、この塩基置換によりIL-12Rβ2鎖蛋白質の720番目の野生型アミノ酸残基His（CAT）がArg（CGT）に置換する多型であった（H720R多型）。

後述するように、この例のような、IL-12Rβ２鎖遺伝子によってコードされるIL-12Rβ２鎖蛋白質の７２０番目のHisをコードする部位の多型は、被験者のアレルギー素因と関連する遺伝子多型であることが明らかになった。

これらの遺伝子多型１～４が認められた被験者より、上述のごとく末梢血単核球を分離し、IL-4、INF-γ、およびIL-12存在下にて細胞を培養し、培養上清中に分泌されたIgE量を測定した。その結果、このような多型塩基またはアミノ酸残基が認められないアレルギー（アトピー）疾患の患者に由来する単核球においては、IL-4により惹起されるIgE産生が、INF-γ、あるいはＩＬ-12共存下においてに抑制されたのに対し、これらの多型塩基またはアミノ酸残基を有するアレルギー（アトピー）疾患の患者に由来する単核球においては、INF-γ共存下において、IgE産生が抑制されたが、IL-12共存下においてはその抑制が認められなかった（第６図）。このことは、IL-12を介したINF-γ産生系の情報伝達における過程において異常が生じ、INF-γが産生されていないことを意味し、IL-12Rに機能的異常が存在することを示している。

以上の結果より、遺伝子多型1～４により、IL-12Rに異常が生じ、その

結果、INF-γの産生が出来ず、INF-γによるIgE産生が、十分に抑制されないことが示された。また、遺伝子多型１～４は、アレルギー（アトピー）疾患の症例において、有意(P=0.0179)に高い頻度で出現していることが示された。

さらに、IL-12Rβ2鎖遺伝子における多型１、３、４は、IL-12刺激によるINF-γ産生量が、検出限界以下であったアレルギー（アトピー）疾患の症例２４名のうち、１０名（１８５６del91多型８名、R313G多型１名、H720R多型１名）に検出されたが、健常者７２名にはいずれの多型塩基またはアミノ酸残基も検出されなかった（第３表）。同様に、A604V多型出現頻度は、アレルギー（アトピー）疾患の症例において有意(P＜0.001)に高いことが示された（第４表）。

第　３　表

対象	数（人）	ヘテロ接合体			
		R313G多型	1856del91多型	H720R多型	計
非アレルギー群	62	0	0	0	0
アレルギー群	75	1	8	1	10
IFN-γ産生量					
＜20 pg/ml	24	1	8	1	10
≧20 pg/ml	51	0	0	0	0

第　４　表

遺伝子型	非アレルギー群 (n=104)	アレルギー群 (n=102)	計 (n=206)
A604V			
C/C	100	81	181
T/C	4	21*	25

*P＜0.001

さらに下記のIL-12Rβ1鎖遺伝子の多型５～７の存在が明らかになった（第５表参照）。

遺伝子多型５（第7図参照）

第7図に示す、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容からわかるように、この遺伝子多型は、IL-12Rβ1鎖遺伝子の1081番目の野生型塩基CがTに置換しており、この塩基置換により、IL-12Rβ1鎖蛋白質の361番目の野生型アミノ酸残基Arg（CGG）が、Trp（TGG）に置換する多型であった（R361W多型）。

後述するように、この例のような、IL-12Rβ１鎖遺伝子によってコードされるIL-12Rβ１蛋白質の３６１番目のArgをコードする部位の多型は、被験者のアレルギー素因と関連する遺伝子多型であることが明らかになった。

遺伝子多型６（第８図参照）

第８図に示す、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容からわかるように、この遺伝子多型は、IL-12Rβ1鎖遺伝子の1094番目の野生型塩基TがCに置換しており、この塩基置換によりIL-12Rβ1鎖蛋白質の３６５番目の野生型アミノ酸残基Met（ATG）がThr（ACG）に置換する多型であった（M365T多型）。

後述するように、この例のような、IL-12Rβ１鎖遺伝子によってコードされるIL-12Rβ１鎖蛋白質の３６５番目のメチオニンをコードする部位の多型は、被験者のアレルギー素因と関連する遺伝子多型であることが明らかになった。

遺伝子多型７（第９図参照）

第９図に示す、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容からわかるように、この遺伝子多型は、IL-12Rβ1鎖遺伝子の1132番目の野生型塩基GがCに置換しており、この塩基置換によりIL-12Rβ1鎖蛋白質の３７８番目の野生型アミノ酸残基Gly（GGG）がArg（CGG）に置換する多型であった（G378R多型）。

後述するように、この例のような、IL-12Rβ１鎖遺伝子によってコー

ドされるIL-12Rβ１鎖蛋白質の３７８番目のグリシンをコードする部位の多型は、被験者のアレルギー素因と関連する遺伝子多型であることが明らかになった。

第５表に、上記の３種類の、IL-12Rβ1鎖遺伝子の多型の頻度を示した。アレルギー（アトピー）疾患の患者では、健常者に比べて、いずれも高頻度に多型塩基またはアミノ酸残基が認められた。

第　５　表

遺伝子型	非アレルギー群(n=50)	アレルギー群(n=45)
Ｒ３６１Ｗ		
C/C	５０	４４
T/C	0	1
T/T	0	0
Ｍ３６５Ｔ		
T/T	３３	２２
C/T	5	8
C/C	１２	１５
Ｇ３７８Ｒ		
G/G	３３	２２
C/G	5	8
C/C	１２	１５

さらに、IL-18Rα鎖遺伝子の多型について解析を行ったところ、アレルギー素因と関連する、下記の新たな遺伝子多型が認められた。

遺伝子多型８（第10図参照）

第10図に示す、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容からわかるように、この遺伝子多型は、野生型IL-18Rα鎖遺伝子の950番目から952番目の３塩基CAGが欠失しており(950del3)、野生型IL-18Rα鎖蛋白質

の317番目のアミノ酸残基Ala１個を欠いた、540個のアミノ酸残基からなる異常な蛋白質の合成が認められる多型であると考えられる。また、この多型は、ゲノムDNAの塩基配列には検出されないことから、オルターネイティブスプライシングによって生じるものと考えられた。

本多型８の多型塩基またはアミノ酸残基を有するアレルギー（アトピー）疾患患者、および、本多型８の多型塩基またはアミノ酸残基が認められないアレルギー（アトピー）疾患患者より、上述のごとく末梢血単核球を分離し、IL-4、およびIL-18存在下にて細胞を培養し、培養上清中に分泌されたIgE量を測定した。その結果、本多型８の多型塩基またはアミノ酸残基が認められないアレルギー（アトピー）疾患患者に由来する単核球においては、IL-4により惹起されるIgE産生がIL-18濃度依存的に抑制されるのに対して、本多型8の多型塩基またはアミノ酸残基を有する患者由来単核球においてはIL-18共存による抑制が認められなかった（第11図）。

このことは、本多型8の多型塩基またはアミノ酸残基が認められる者は、IL-18を介する情報伝達により産生されるINF-γによる抑制がなされていないことを表し、IL-18Rに機能的異常が存在することを示している。この結果より、本遺伝子多型8の多型塩基またはアミノ酸残基により、IL-18Rに異常を生じ、INF-γの産生が出来ず、INF-γによるIgE産生の抑制が機能しないことが示された。また、本多型は、アレルギー（アトピー）疾患症例において有意(P=0.0179)に高い頻度で出現していることが示された（第６表）。

第 6 表

遺伝子型	非アレルギー群 (n=41)	アレルギー群 (n=39)	計 (n=80)
950del3			
wild/wild	9	4*	13
del3/wild	30	26*	56
del3/del3	2	9*	11

*P=0.0179

さらに、INF-γR1鎖遺伝子の多型について解析を行ったところ、アレルギー素因と関連する、下記の新たな多型が認められた。

遺伝子多型９（第12図参照）

第12図に示す、塩基配列と電気泳動図、および、その解析内容からわかるように、この遺伝子多型は、INF-γR1鎖遺伝子の1400番目の野生型塩基Tが、Cに置換しており、この塩基置換により、INF-γR1鎖蛋白質の467番目の野生型アミノ酸残基Leu（CTT）がPro（CCT）に置換していた（L467P多型）。このL467P多型はSTAT1結合部の近傍に生じていることから、本多型９の多型塩基またはアミノ酸残基の存在により、重要な情報伝達分子である、STAT1が結合できなくなり、シグナルの伝達が抑制されるものと考えられる。

また、本多型９についての家系解析より、本多型９の多型塩基またはアミノ酸残基は、気管支喘息、あるいはアトピー性皮膚炎の疾患を有する家族にのみ認められることから、このL467P多型に代表される、INF-γR１鎖蛋白質の４６７番目のロイシンをコードする部位の多型は、気管支喘息、あるいはアトピー性皮膚炎に特徴的な遺伝子多型であると考えられる（第13図：図中、ＢＡは、気管支喘息を表し、ＡＲは、アレルギー性鼻炎を表す）。さらに、アレルギー（アトピー）疾患症例114名と非アレルギー（アトピー）群102名を対象に、L467P多型について検討したところ、本多型９は、アレルギー（アトピー）疾患症例6名(2.8%)にのみ

多型塩基またはアミノ酸残基が検出された。

この結果より、L467P多型は、アレルギー（アトピー）性疾患の原因の一つであることが示された（第７表）。

第　７　表

遺伝子型	非アレルギー群 (n=102)	アレルギー群 (n=14)	計 (n=216)
L467P			
T/T	102	108*	210 (97.2%)
C/T	0	6*	6 (2.8%)
C/C	0	0	0 (0%)

*P=0.033

遺伝子多型１０・１１（第１３図参照）

遺伝子多型１０は、IL-12p40をコードするゲノム遺伝子配列のイントロン１の３６９６番目の野生型塩基であるグアニンと、多型塩基であるアデニンで規定される遺伝子多型（３６９６G/A）である。また、遺伝子多型１１は、同イントロン１の３７５７番目の野生型塩基であるシトシンと、多型塩基であるチミンで規定される遺伝子多型（３７５７C/T）である。

これらの遺伝子多型について、それぞれ、アレルギー群（３３名）と、非アレルギー群（３３名）における頻度を検討したところ、第８表に示したように、遺伝子多型１０におけるアレルギー群は、Aアレルの出現頻度が有意に（P＝0.0146）高いことが判明した。

また、第９表に示したように、遺伝子多型１１におけるアレルギー群は、Aアレルの出現頻度が有意に（P＝0.0146）高いことが判明した。

また、遺伝子多型１０と１１の解析結果が同一であったことから、これらの遺伝子多型は、互いに連鎖平行の関係にあることが示された。

第 8 表

遺伝子型	非アレルギー群 (n=33)	アレルギー群 (n=33)	計 (n=66)
３６９６G/A			
G/G	１２	5	１７
A/G	１４	１４	２８
A/A	7	１４	２１
アレル出現頻度			
Gアレル	０．５６７	０．３６７	
Aアレル	０．４２４	０．６３８	P＝０．０１４６

第 9 表

遺伝子型	非アレルギー群 (n=33)	アレルギー群 (n=33)	計 (n=66)
３７５７C/T			
C/C	１２	5	１７
T/C	１４	１４	２８
T/T	7	１４	２１
アレル出現頻度			
Cアレル	０．５６７	０．３６７	
Tアレル	０．４２４	０．６３８	P＝０．０１４６

遺伝子多型１２・１３[第１４図（多型１２）、第１５図（多型１３）参照]

遺伝子多型１２は、IL-12p40をコードするゲノム遺伝子配列のイントロン４の１２３５９番目の野生型塩基であるチミンと、多型塩基であるグアニンで規定される遺伝子多型（１２３５９T/G）である。また、遺伝子多型１３は、同イントロン６の１６０７８番目の野生型塩基である

シトシンと、多型塩基であるチミンで規定される遺伝子多型（１６０７８C/T）である。

これらの遺伝子多型について、それぞれ、アレルギー群（４１名）と、非アレルギー群（５７名）における頻度を検討したところ、第１０表に示したように、遺伝子多型１２におけるアレルギー群は、Gアレルの出現頻度が非常に高い傾向である（P＝0.06495）ことが判明した。

また、第１１表に示したように、遺伝子多型１３におけるアレルギー群は、Tアレルの出現頻度が非常に高い傾向である（P＝0.06495）ことが判明した。

また、遺伝子多型１２と１３の解析結果が同一であったことから、これらの遺伝子多型は、互いに連鎖平行の関係にあることが示された。

第　１０　表

遺伝子型	非アレルギー群 (n=41)	アレルギー群 (n=57)	計 (n=98)
１２３５９T/G			
T/T	３５	４８	８３
G/T	6	8	１４
G/G	0	1	1
アレル出現頻度			
Tアレル	０．９２７	０．９１２	
Gアレル	０．０７３	０．０８８	P＝０．０６４９５

第　１１　表

遺伝子型	非アレルギー群 (n=41)	アレルギー群 (n=57)	計 (n=98)
１６０７８C/T			
C/C	３５	４８	８３
T/C	6	8	１４
T/T	0	1	1
アレル出現頻度			
Cアレル	０．９２７	０．９１２	
Tアレル	０．０７３	０．０８８	P＝０．０６４９５

産業上の利用可能性

本発明により、アレルギーに関連する遺伝子多型を指標として、アレルギー素因を検出可能な、遺伝子の検出方法が提供される。

請求の範囲

1．下記１～13で示される遺伝子多型からなる群から選ばれる１種以上の遺伝子多型を検出することにより、被験者のアレルギー素因を検出する、遺伝子の検出方法。

１．インターロイキン１２レセプターβ２鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン１２レセプターβ２鎖蛋白質の３１３番目のアルギニンをコードする部位の遺伝子多型。

２．インターロイキン１２レセプターβ２鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン１２レセプターβ２鎖蛋白質の６０４番目のアラニンをコードする部位の遺伝子多型。

３．インターロイキン１２レセプターβ２鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン１２レセプターβ２鎖蛋白質の６１９番目のグリシン以降のアミノ酸をコードする部位が欠失するか否かで規定される遺伝子多型。

４．インターロイキン１２レセプターβ２鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン１２レセプターβ２鎖蛋白質の７２０番目のヒスチジンをコードする部位の遺伝子多型。

５．インターロイキン１２レセプターβ１鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン１２レセプターβ１鎖蛋白質の３６１番目のアルギニンをコードする部位の遺伝子多型。

６．インターロイキン１２レセプターβ１鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン１２レセプターβ１鎖蛋白質の３６５番目のメチオニンをコードする部位の遺伝子多型。

７．インターロイキン１２レセプターβ１鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン１２レセプターβ１鎖蛋白質の３７８番目のグリシンをコードする部位の遺伝子多型。

８．インターロイキン１８レセプターα鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン１８レセプターα鎖蛋白質の３１７番目のアラニン

が欠失しているか否かで規定される遺伝子多型。

9．インターフェロンγレセプター１鎖遺伝子によってコードされるインターフェロンγレセプター１鎖蛋白質の４６７番目のロイシンをコードする部位の遺伝子多型。

10．インターロイキン１２・ｐ４０サブユニット遺伝子のイントロン１の３６９６番目のグアニンと他塩基との置換として規定される多型。

11．インターロイキン１２・ｐ４０サブユニット遺伝子のイントロン１の３７５７番目のシトシンと他塩基との置換として規定される多型。

12．インターロイキン１２・ｐ４０サブユニット遺伝子のイントロン４の１２３５９番目のチミンと他塩基との置換として規定される多型。

13．インターロイキン１２・ｐ４０サブユニット遺伝子のイントロン６の１６０７８番目のシトシンと他塩基との置換として規定される多型。

２．請求項１記載の遺伝子の検出方法において、１．インターロイキン１２レセプターβ２鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン１２レセプターβ２鎖蛋白質の３１３番目のアルギニンをコードする部位の遺伝子多型が、インターロイキン１２レセプターβ２鎖遺伝子の９３７番目の多型塩基がグアニンであり、当該３１３番目の多型アミノ酸残基がグリシンであることで規定される遺伝子多型である、遺伝子の検出方法。

３．請求項１または２記載の遺伝子の検出方法において、２．インターロイキン１２レセプターβ２鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン１２レセプターβ２鎖蛋白質の６０４番目のアラニンをコードする部位の遺伝子多型が、インターロイキン１２レセプターβ２鎖遺伝子の１８１１番目の多型塩基がチミンであり、当該６０４番目の多型アミノ酸残基がバリンであることで規定される遺伝子多型である、遺伝子の検出方法。

４．請求項１～３のいずれかに記載の遺伝子の検出方法において、３．インターロイキン１２レセプターβ２鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン１２レセプターβ２鎖蛋白質の６１９番目のグリシン以

降のアミノ酸が欠失するか否かで規定される遺伝子多型が、インターロイキン１２レセプターβ２鎖遺伝子の１８５６～１９４６番目の塩基を欠失するか否かで規定される遺伝子多型である、遺伝子の検出方法。

５．請求項１～４のいずれかに記載の遺伝子の検出方法において、４．インターロイキン１２レセプターβ２鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン１２レセプターβ２鎖蛋白質の７２０番目のヒスチジンをコードする部位の遺伝子多型が、インターロイキン１２レセプターβ２鎖遺伝子の２１５９番目の多型塩基がグアニンとして規定され、当該７２０番目の多型アミノ酸残基がアルギニンとして規定される遺伝子多型である、遺伝子の検出方法。

６．請求項１～５のいずれかに記載の遺伝子の検出方法において、５．インターロイキン１２レセプターβ１鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン１２レセプターβ１鎖蛋白質の３６１番目のアルギニンをコードする部位の遺伝子多型が、インターロイキン１２レセプターβ１鎖遺伝子の１０８１番目の多型塩基がチミンで規定され、当該３６１番目の多型アミノ酸残基がトリプトファンで規定される遺伝子多型である、遺伝子の検出方法。

７．請求項１～６のいずれかに記載の遺伝子の検出方法において、６．インターロイキン１２レセプターβ１鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン１２レセプターβ１鎖蛋白質の３６５番目のメチオニンをコードする部位の遺伝子多型が、インターロイキン１２レセプターβ1鎖遺伝子の１０９４番目の多型塩基がシトシンで規定され、当該３６５番目の多型アミノ酸残基がスレオニンで規定される遺伝子多型である、遺伝子の検出方法。

８．請求項１～７のいずれかに記載の遺伝子の検出方法において、７．インターロイキン１２レセプターβ1鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン１２レセプターβ１鎖蛋白質の３７８番目のグリシンをコードする部位の遺伝子多型が、インターロイキン１２レセプターβ１鎖遺伝子の１１３２番目の多型塩基がシトシンであり、上記の３７８番

目の多型アミノ酸残基がアルギニンへの置換である、遺伝子の検出方法。

９．請求項１～８のいずれかに記載の遺伝子の検出方法において、８．インターロイキン１８レセプターα鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン１８レセプターα鎖蛋白質の３１７番目のアラニンが欠失するか否かで規定される遺伝子多型が、インターロイキン１８レセプターα鎖遺伝子の９５０～９５２番目の塩基が欠失することにより現れる、遺伝子の検出方法。

１０．請求項１～９のいずれかに記載の遺伝子の検出方法において、９．インターフェロンγレセプター１鎖遺伝子によってコードされるインターフェロンγレセプター１鎖蛋白質の４６７番目のロイシンをコードする部位の遺伝子多型が、インターフェロンγレセプター１鎖遺伝子の１４００番目の多型塩基がシトシンであり、当該４６７番目の多型アミノ酸残基がプロリンとして規定される、遺伝子の検出方法。

１１．請求項１～１０のいずれかに記載の遺伝子の検出方法において、10．インターロイキン１２・ｐ４０サブユニット遺伝子のイントロン１の３６９６番目の多型塩基がアデニンである、遺伝子の検出方法。

１２．請求項１～１１のいずれかに記載の遺伝子の検出方法において、11．インターロイキン１２・ｐ４０サブユニット遺伝子のイントロン１の３７５７番目の多型塩基がチミンである、遺伝子の検出方法。

１３．請求項１～１２のいずれかに記載の遺伝子の検出方法において、12．インターロイキン１２・ｐ４０サブユニット遺伝子のイントロン４の１２３５９番目の多型塩基がグアニンである、遺伝子の検出方法。

１４．請求項１～１３のいずれかに記載の遺伝子の検出方法において、13．インターロイキン１２・ｐ４０サブユニット遺伝子のイントロン６の１６０７８番目の多型塩基がチミンである、遺伝子の検出方法。

１５．請求項１～１４のいずれかに記載の遺伝子の検出方法において、インターロイキン１２・ｐ４０サブユニット遺伝子のイントロンにおける遺伝子多型の検出を行う場合に、同イントロン１の３６９６番目の塩基の多型、および、同３７５７番目の塩基の多型のいずれか一方の検出

を行う、遺伝子の検出方法。

１６．請求項１～１５のいずれかに記載の遺伝子の検出方法において、インターロイキン１２・ｐ４０サブユニット遺伝子のイントロンにおける遺伝子多型の検出を行う場合に、同イントロン４の１２３５９番目の塩基の多型、および、同イントロン６の１６０７８番目の多型のいずれか一方の検出を行う、遺伝子の検出方法。

１７．請求項１～１６のいずれかに記載の検出方法が、インベーダー・アッセイ法を行って遺伝子多型を検出する方法である、遺伝子の検出方法。

１８．下記１～13で示される遺伝子多型からなる群から選ばれる１種以上の遺伝子多型を検出するための要素が備わっている、遺伝子検出用キット。

１．インターロイキン１２レセプターβ２鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン１２レセプターβ２鎖蛋白質の３１３番目のアルギニンをコードする部位の遺伝子多型。

２．インターロイキン１２レセプターβ２鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン１２レセプターβ２鎖蛋白質の６０４番目のアラニンをコードする部位の遺伝子多型。

３．インターロイキン１２レセプターβ２鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン１２レセプターβ２鎖蛋白質の６１９番目のグリシン以降のアミノ酸をコードする部位が欠失するか否かで規定される遺伝子多型。

４．インターロイキン１２レセプターβ２鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン１２レセプターβ２鎖蛋白質の７２０番目のヒスチジンをコードする部位の遺伝子多型。

５．インターロイキン１２レセプターβ１鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン１２レセプターβ１鎖蛋白質の３６１番目のアルギニンをコードする部位の遺伝子多型。

６．インターロイキン１２レセプターβ１鎖遺伝子によってコードさ

れるインターロイキン１２レセプターβ１鎖蛋白質の３６５番目のメチオニンをコードする部位の遺伝子多型。

７．インターロイキン１２レセプターβ１鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン１２レセプターβ１鎖蛋白質の３７８番目のグリシンをコードする部位の遺伝子多型。

８．インターロイキン１８レセプターα鎖遺伝子によってコードされるインターロイキン１８レセプターα鎖蛋白質の３１７番目のアラニンが欠失しているか否かで規定される遺伝子多型。

９．インターフェロンγレセプター１鎖遺伝子によってコードされるインターフェロンγレセプター１鎖蛋白質の４６７番目のロイシンをコードする部位の遺伝子多型。

10．インターロイキン１２・ｐ４０サブユニット遺伝子のイントロン１の３６９６番目のグアニンと他塩基との置換として規定される多型。

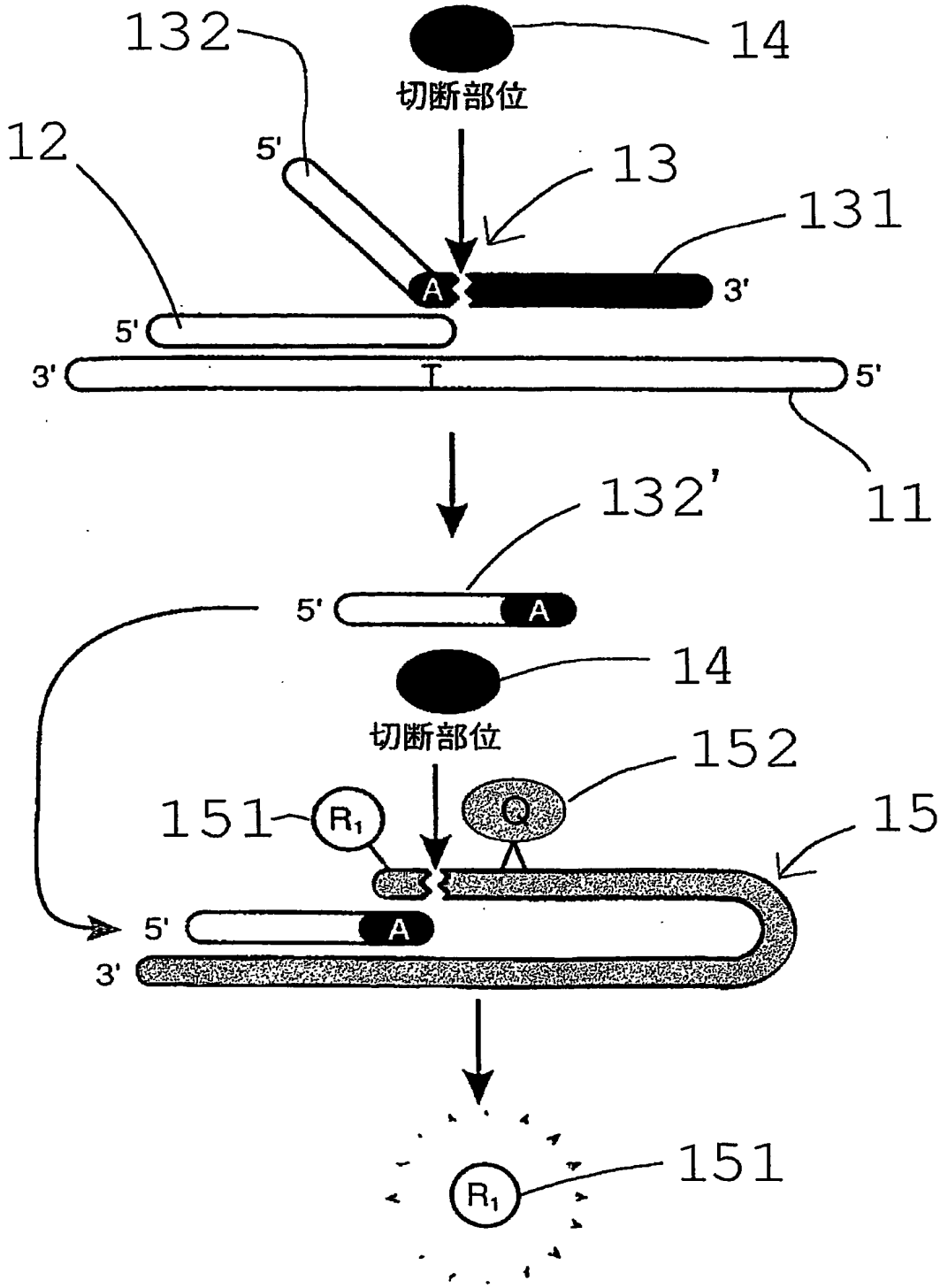
11．インターロイキン１２・ｐ４０サブユニット遺伝子のイントロン１の３７５７番目のシトシンと他塩基との置換として規定される多型。

12．インターロイキン１２・ｐ４０サブユニット遺伝子のイントロン４の１２３５９番目のチミンと他塩基との置換として規定される多型。

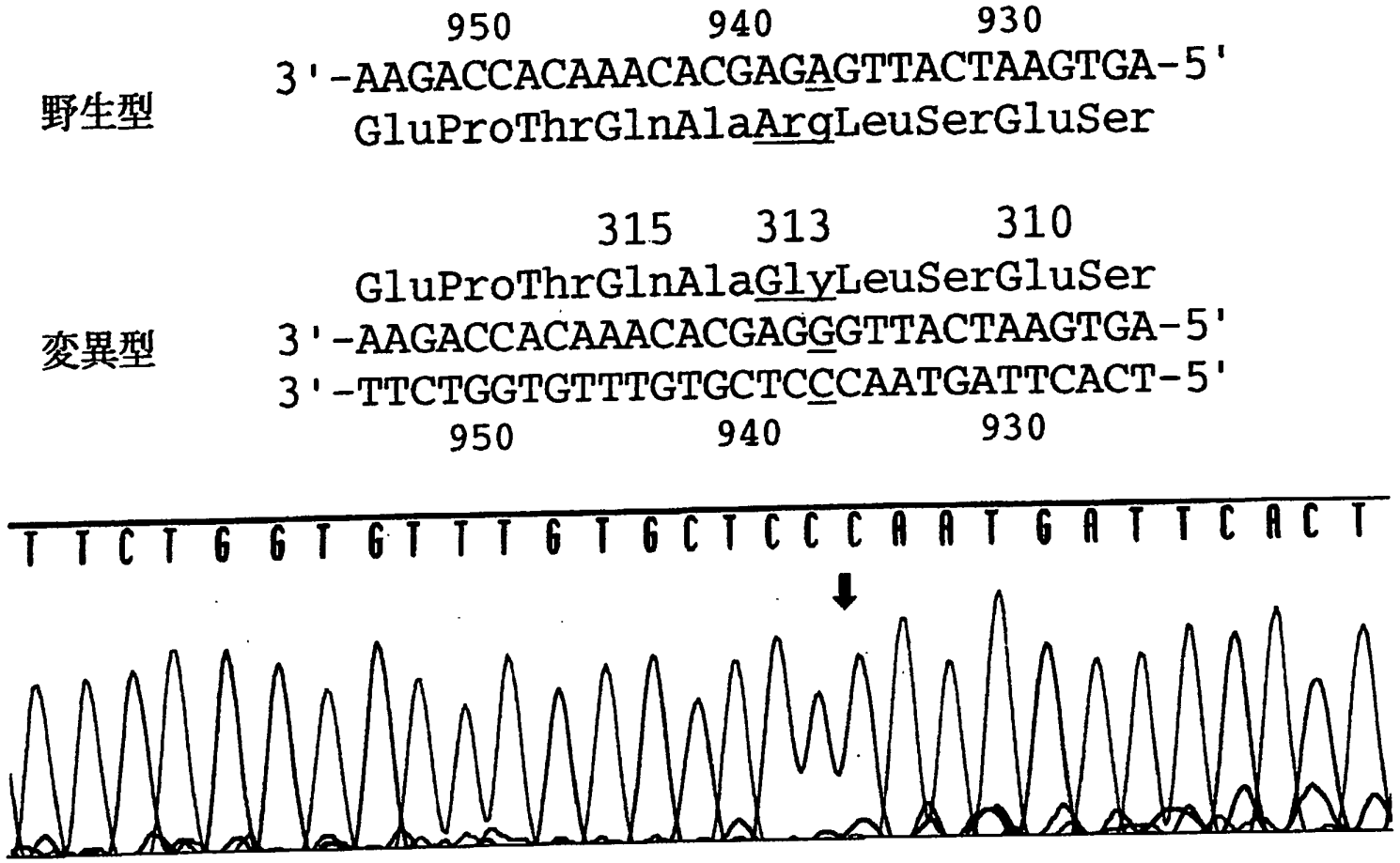
13．インターロイキン１２・ｐ４０サブユニット遺伝子のイントロン６の１６０７８番目のシトシンと他塩基との置換として規定される多型。

１９．請求項１８のキットが、インベーダー・アッセイ法を行って、遺伝子多型を検出するキットである、遺伝子検出用キット。

第 1 図


132
14
切断部位
12
5'
13
131
A
3'
5'
3'
5'
11
132'
5'
A
14
切断部位
152
151
R1
Q
15
5'
A
3'
151
R1

第 2 図


950
940
930
野生型
3'-AAGACCACAAACACGAGAGTTACTAAGTGA-5'
GluProThrGlnAlaArgLeuSerGluSer
315
313
310
GluProThrGlnAlaGlyLeuSerGluSer
変異型
3'-AAGACCACAAACACGAGGGTTACTAAGTGA-5'
3'-TTCTGGTGTTTGTGCTCCCAATGATTCACT-5'
950
940
930
T T C T G G T G T T T G T G C T C C C A A T G A T T C A C T

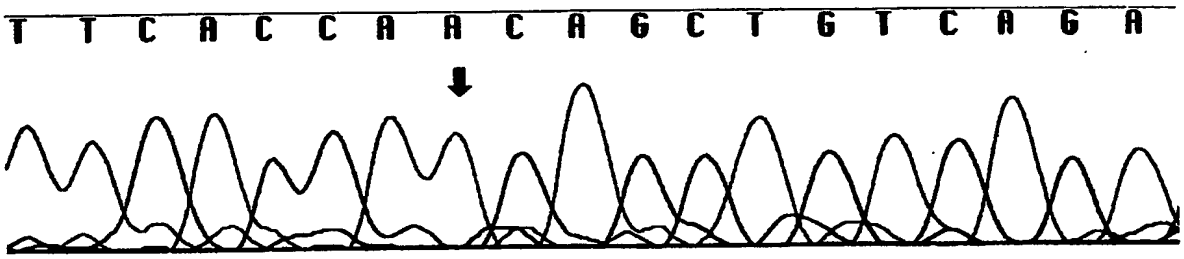
第 3 図

野生型

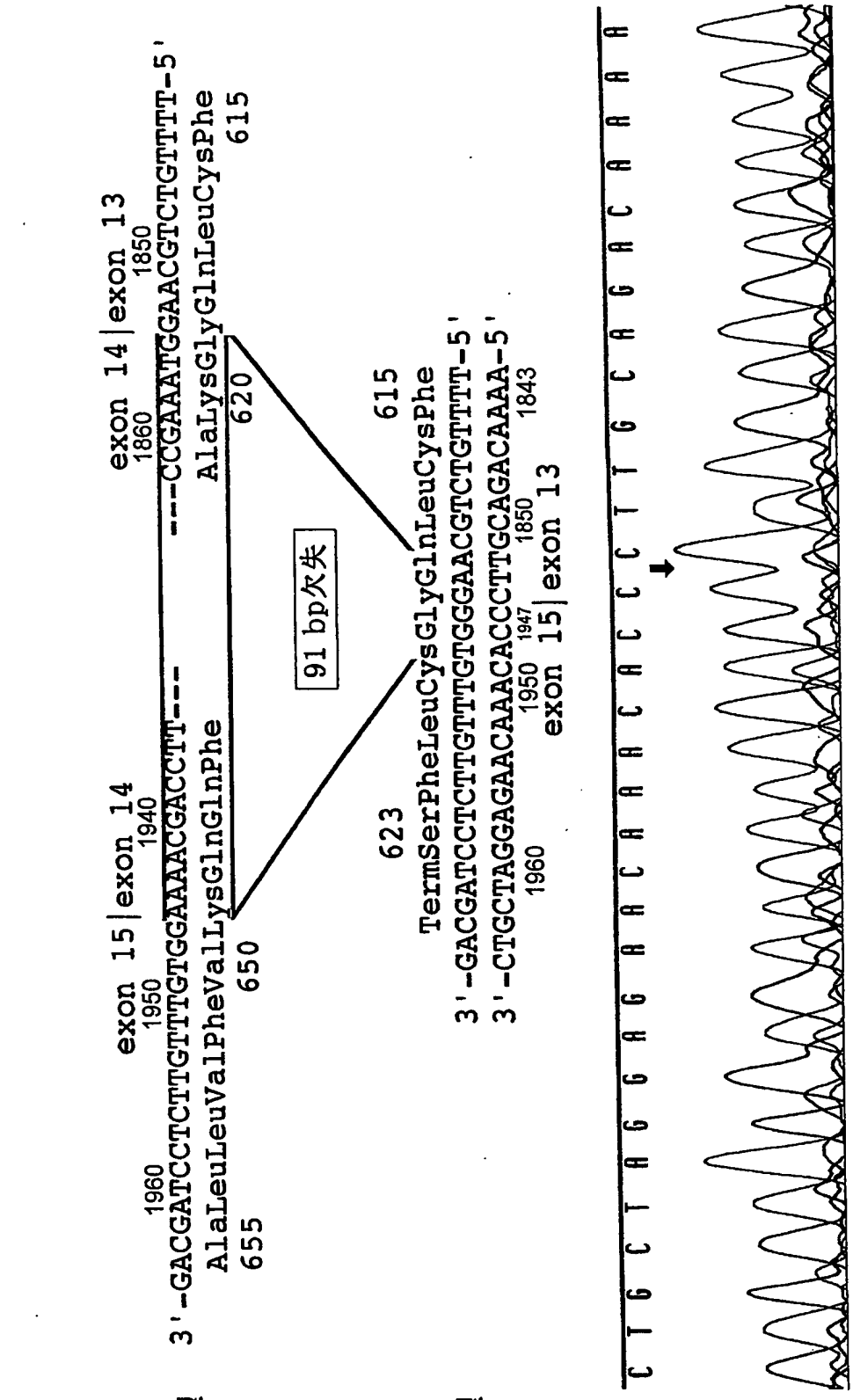
```
1818      1810        1800
3'-AAGTGGTCGTCGACAGTCT-5'
   GluGlyAlaAlaThrLeu
```

変異型

```
          604       601
   GluGlyValAlaThrLeu
3'-AAGTGGTTGTCGACAGTCT-5'
3'-TTCACCAACAGCTGTCAGA-5'
 1818      1810        1800
```



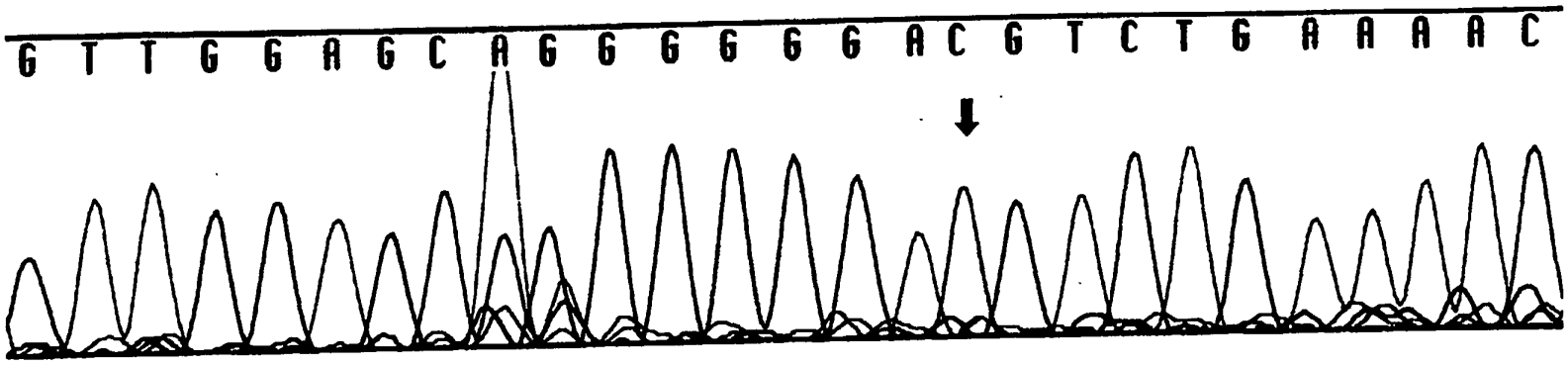
第 4 図


野生型
exon 15|exon 14
1950 1940
1960
3'-GACGATCCTCTTGTTTGTGGAAAACGACCTTT---
AlaLeuLeuValPheValLysGlnGlnPhe
655 650
exon 14|exon 13
1860 1850
---CCGAAATGGAACGTCTGTTTT-5'
AlaLysGlyGlnLeuCysPhe
620 615
91 bp欠失
変異型
623 615
TermSerPheLeuCysGlyGlnLeuCysPhe
3'-GACGATCCTCTTGTTTGTGGGAACGTCTGTTTT-5'
3'-CTGCTAGGAGAACAAACACCCTTGCAGACAAAA-5'
1960 1950 1947 1850 1843
exon 15|exon 13
C T G C T A G G A G A A C A A A C A C C C T T G C A G A C A A A A

第５図

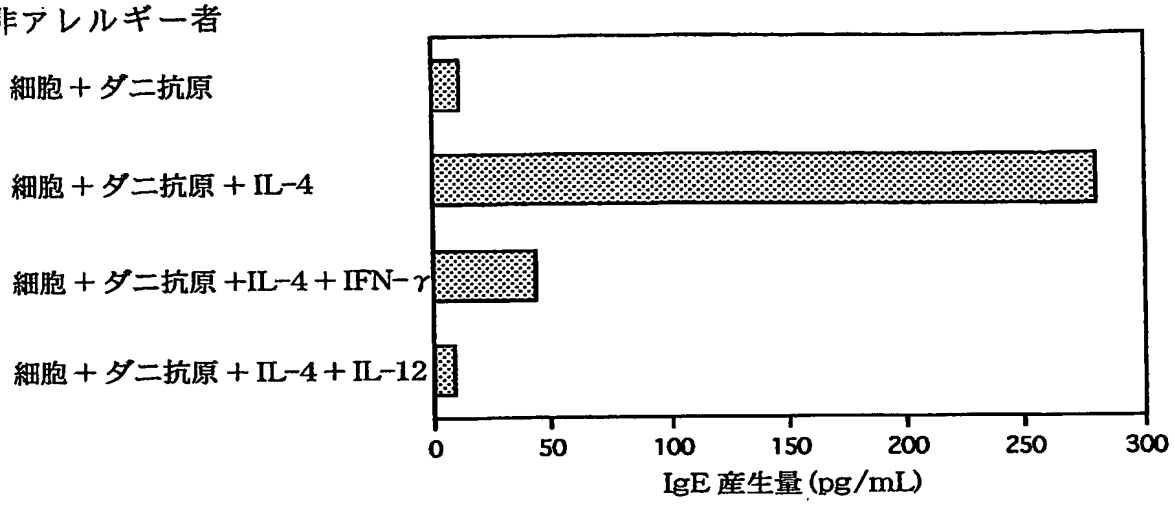
```
                    2170        2160        2150
野生型      3'-CAACCTCGTCCCCCCTACAGACTTTTG-5'
               AsnSerCysProProHisArgPheVal

                    725         720         717
               AsnSerCysProProArgArgPheVal
変異型      3'-CAACCTCGTCCCCCCTGCAGACTTTTG-5'
            3'-GTTGGAGCAGGGGGGACGTCTGAAAAC-5'
                    2170        2160        2150
```

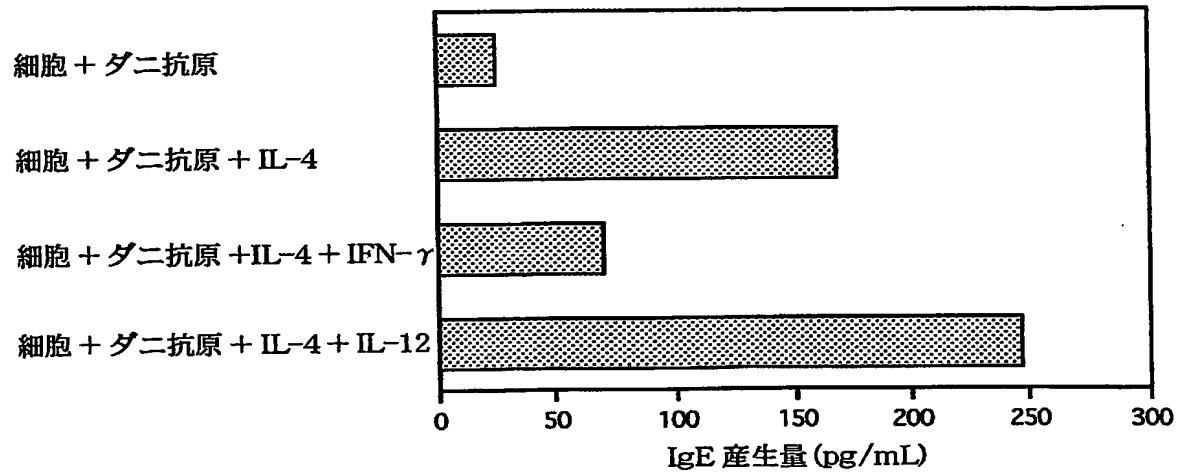


第 6 図

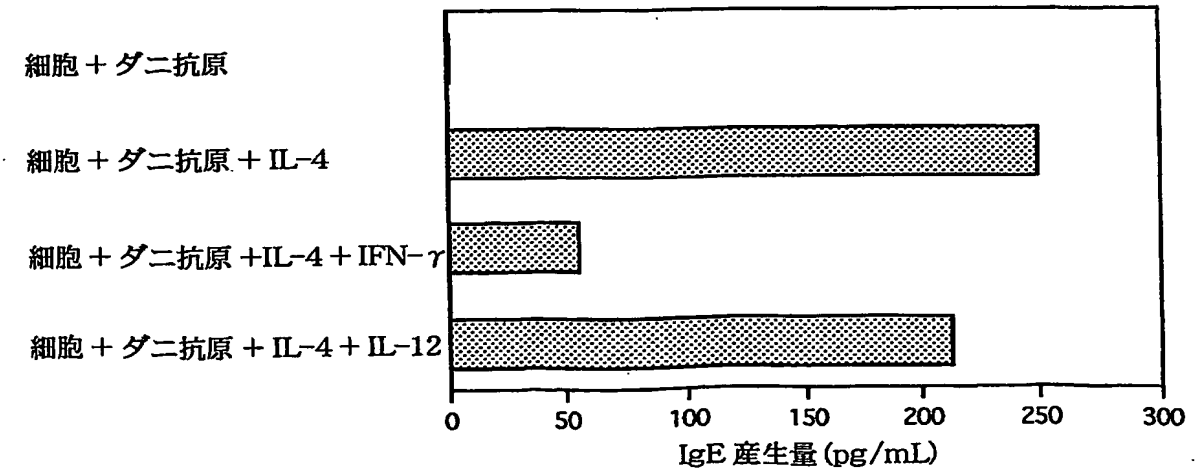
a)非アレルギー者



b)1856del191のアレルギー患者



c)A604Vのアレルギー患者

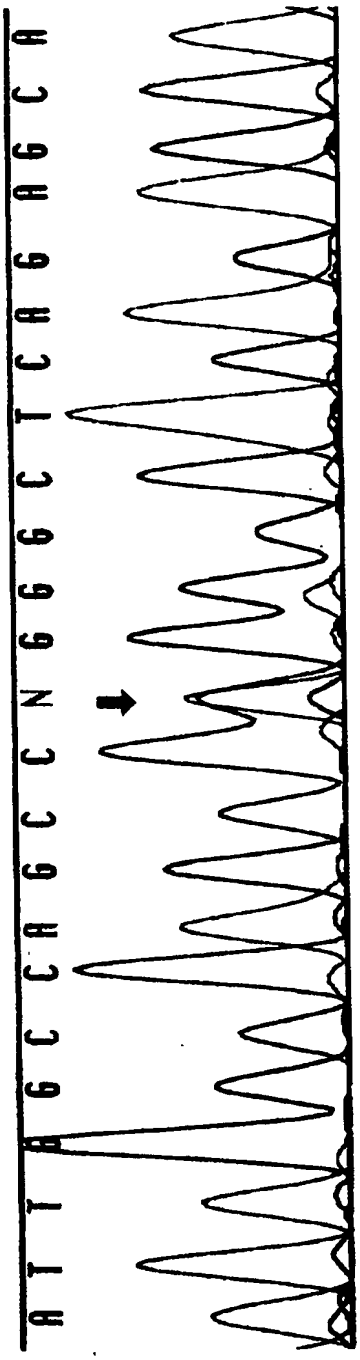


第 7 図

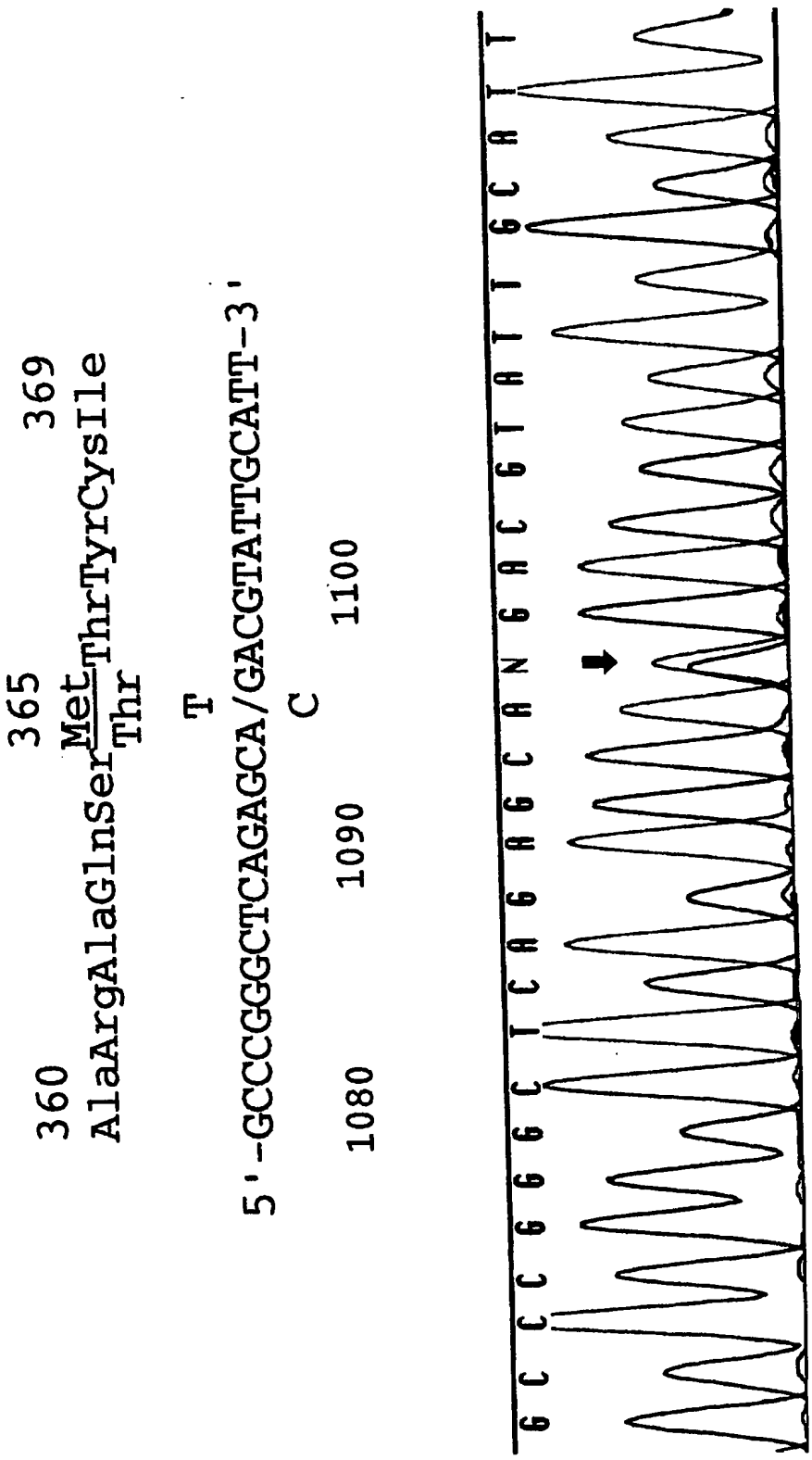
358 360 364
TrpProAla(Arg/Trp)AlaGlnSer

C
5'-ATTGGCCAGCC/GGGCTCAGAGCA-3'
T

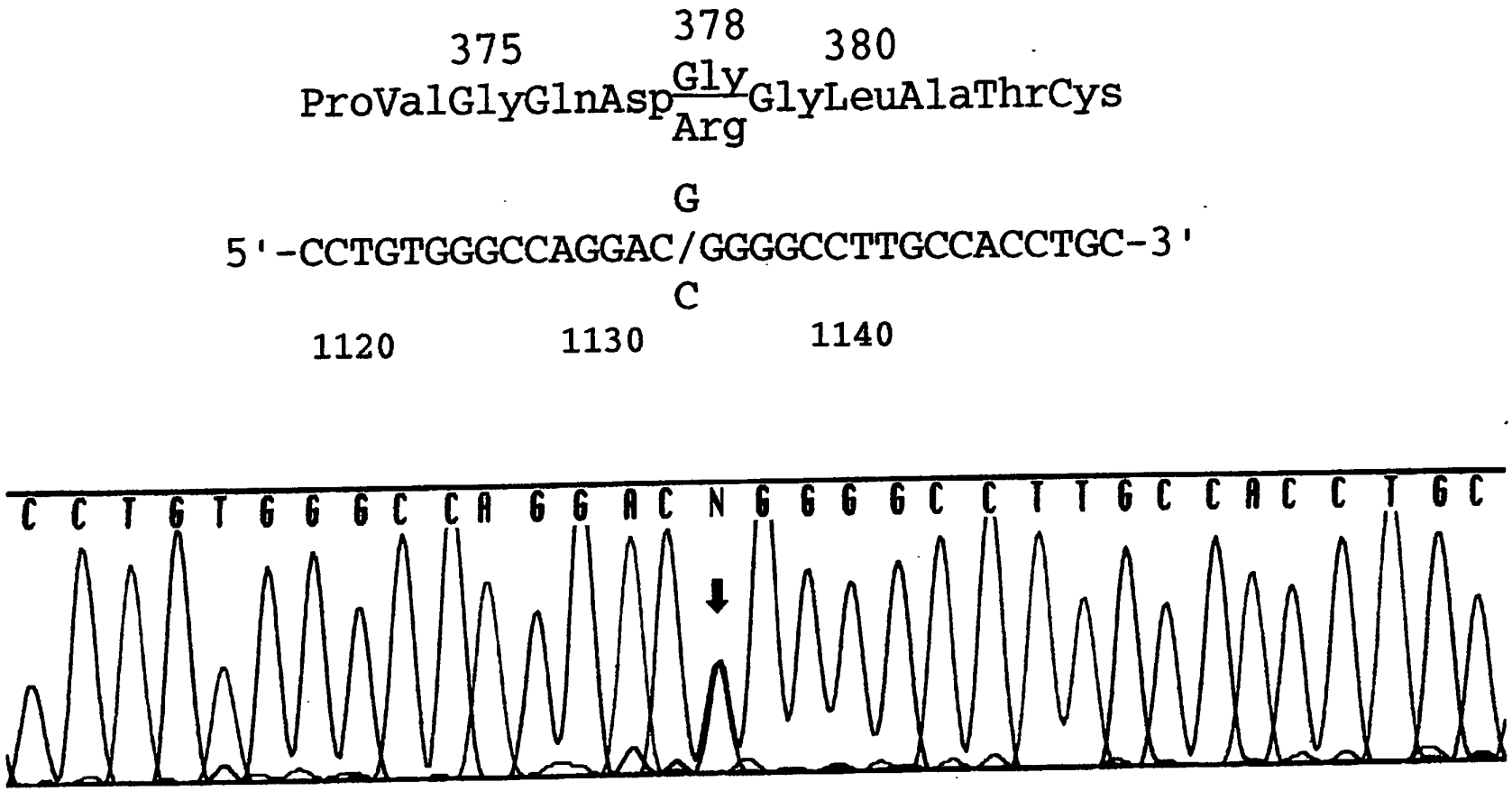
1070 1080 1090



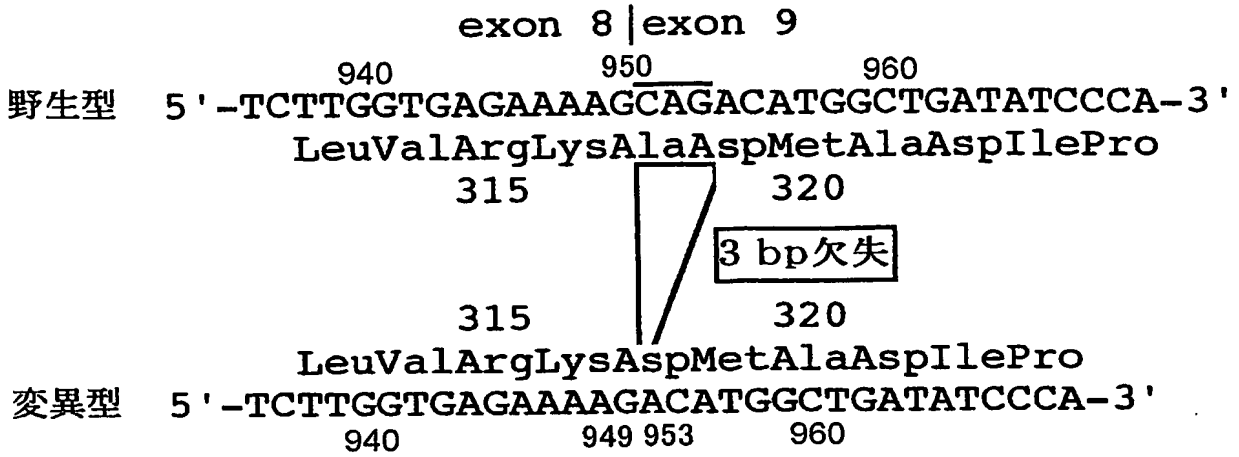
第８図

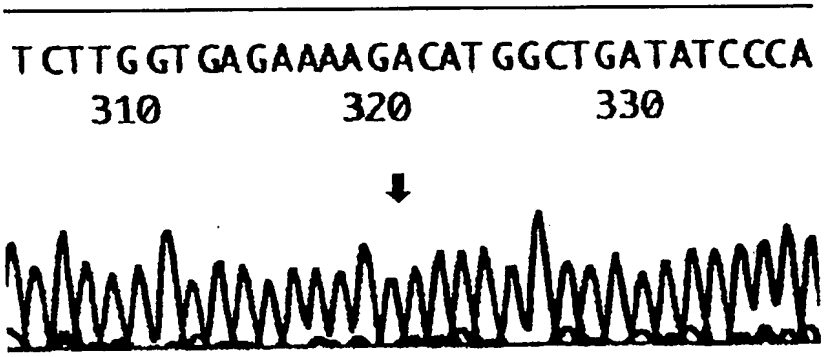

365
369
360
AlaArgAlaGlnSerMetThrTyrCysIle
Thr
T
5'-GCCCGGGCTCAGAGCA/GACGTATTGCATT-3'
C
1080
1090
1100
GCCCGGGCTCAGAGCANGACGTATTGCATT

第 9 図


375
378
380
ProValGlyGlnAsp
Gly
Arg
GlyLeuAlaThrCys
G
5'-CCTGTGGGCCAGGAC/GGGGCCTTGCCACCTGC-3'
C
1120
1130
1140
C C T G T G G G C C A G G A C N G G G G C C T T G C C A C C T G C

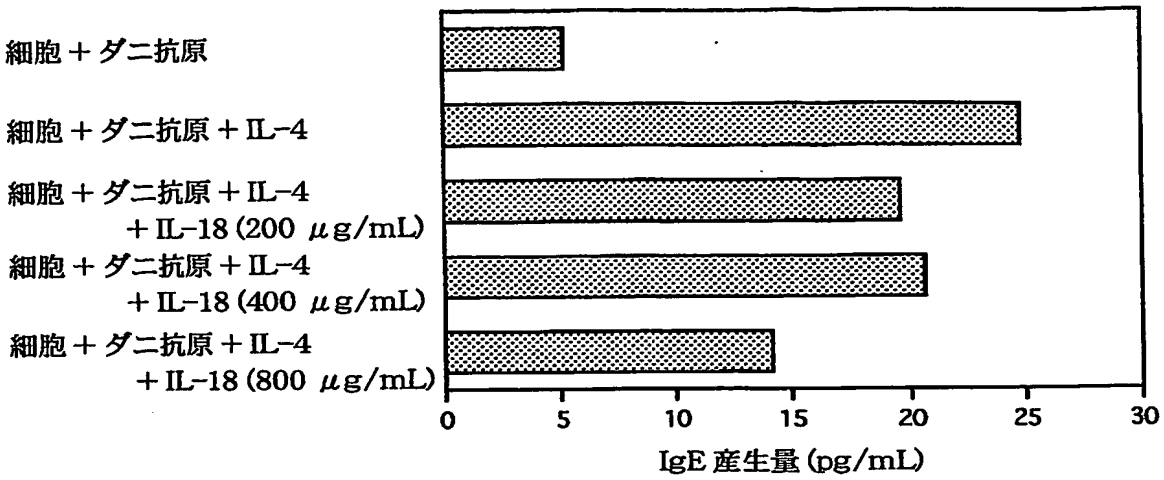
第 10 図


exon 8|exon 9
940
950
960
野生型 5'-TCTTGGTGAGAAAAGCAGACATGGCTGATATCCCA-3'
LeuValArgLysAlaAspMetAlaAspIlePro
315
320
3 bp欠失
315
320
LeuValArgLysAspMetAlaAspIlePro
変異型 5'-TCTTGGTGAGAAAAGACATGGCTGATATCCCA-3'
940
949 953
960

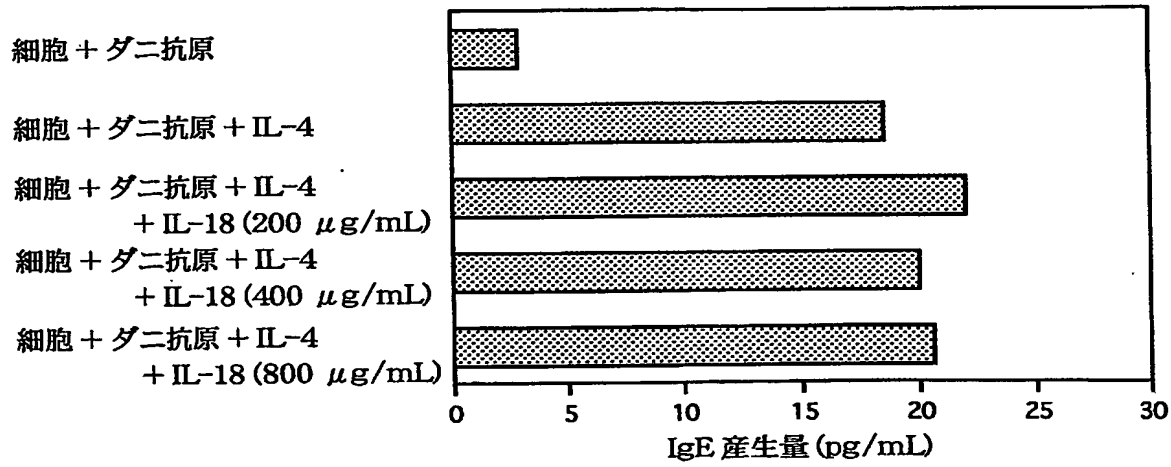

TCTTGGTGAGAAAAGACATGGCTGATATCCCA
310
320
330

第 11 図

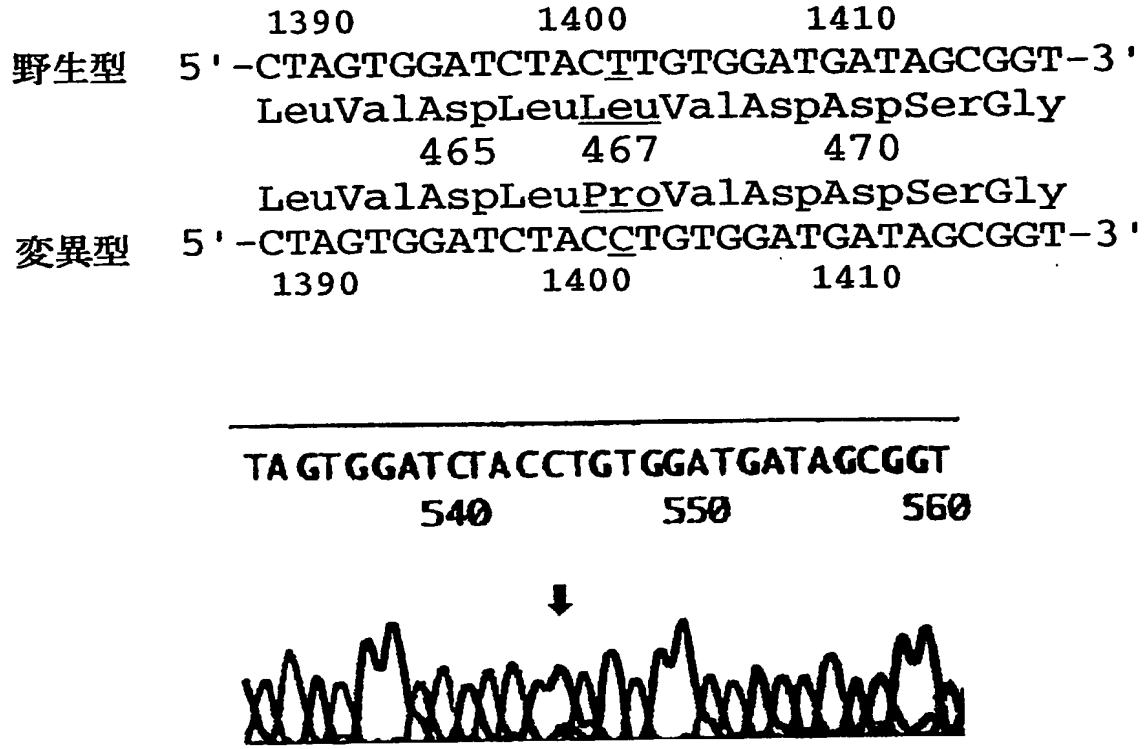
a)非アレルギー者



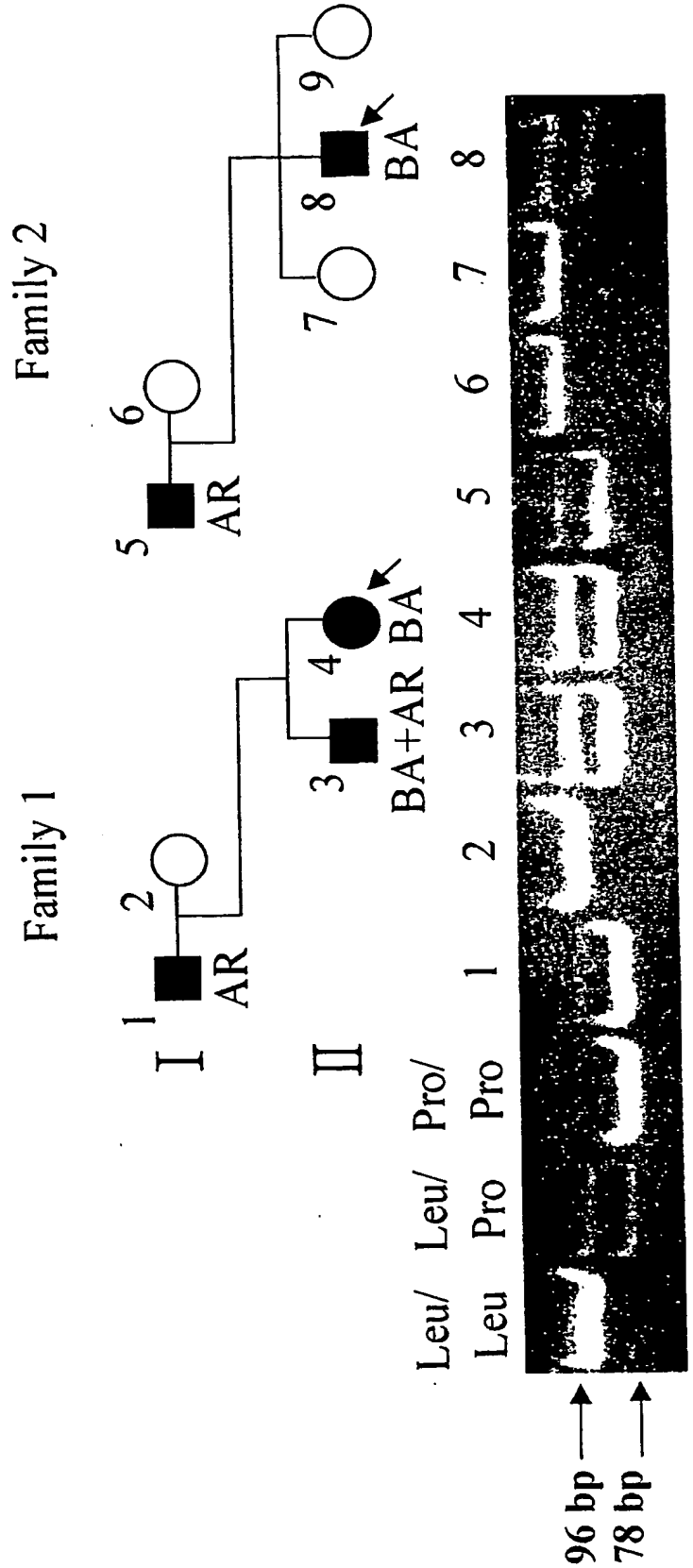
b)950del3のアレルギー患者



第 12 図


1390
1400
1410
野生型 5'-CTAGTGGATCTACTTGTGGATGATAGCGGT-3'
LeuValAspLeuLeuValAspAspSerGly
465 467 470
LeuValAspLeuProValAspAspSerGly
変異型 5'-CTAGTGGATCTACCTGTGGATGATAGCGGT-3'
1390
1400
1410
TAGTGGATCTACCTGTGGATGATAGCGGT
540
550
560

第 13 図


Family 1
Family 2
I
II
1
2
3
4
5
6
7
8
9
AR
AR
BA+AR
BA
BA
Leu/ Leu/ Pro/
Leu Pro Pro
1 2 3 4 5 6 7 8
96 bp
78 bp

第 14 図

```
      3660        3670        3680        3690        3700        3710
gtgccaccca tgccatctgt gactatatct ttttattctt taatagtaac tccctttctc
                                                    ↑
                                                    A :3696G/A

      3720        3730        3740        3750        3760        3770
aattaaaggt aacaaacaaa acttaaaaaa gagatgccca cccaagcgtc attggcatgc
                                                     ↑
                                                     C :3757C/T

      3780        3790        3800        3810        3820        3830
tgatgttggc accagtgttg ggaagccctt agcatactcc aggaagtagg agtgtgtaac

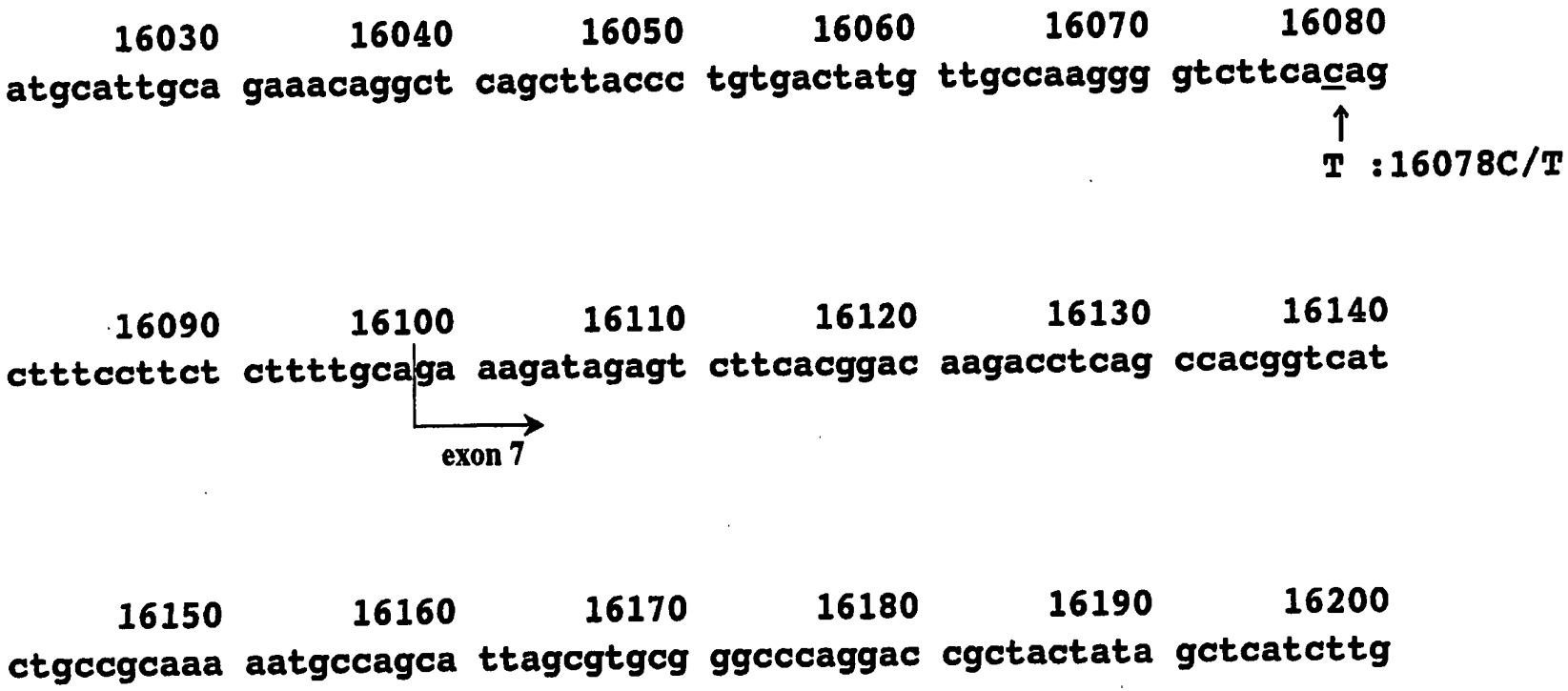
      3840        3850        3860        3870        3880        3890
gtggggtccc tttgtccttc atgcaagggt ttcaagagtt tagaaaacct atgaaattgc
```

第 15 図

```
12310      12320      12330      12340      12350      12360
caacagttga ggccttacct gccttactgg ctacaatcac taggaactct ctcccaatg
                                                      ↑
                                                      G :12359T/G

12370      12380      12390      12400      12410      12420
tgtaacacag gctaatttct gtctttgact tcagctcttc tgacccccaa ggggtgacgt
                                  ↑
                                  exon 5
```

第 16 図


16030 16040 16050 16060 16070 16080
atgcattgca gaaacaggct cagcttaccc tgtgactatg ttgccaaggg gtcttcacag
T :16078C/T
16090 16100 16110 16120 16130 16140
ctttccttct cttttgcaga aagatagagt cttcacggac aagacctcag ccacggtcat
exon 7
16150 16160 16170 16180 16190 16200
ctgccgcaaa aatgccagca ttagcgtgcg ggcccaggac cgctactata gctcatcttg

SEQUENCE LISTING

<110> BML, INC.
KONDO, Naomi

<120> Method of Detecting Allergy

<130> PBM78/PCT2

<140>
<141>

<150> JP P2002-252446
<151> 2002-8-30

<150> PCT/JP02/10018
<151> 2002-9-27

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 3400
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2589)

<400> 1
atg gca cat act ttt aga gga tgc tca ttg gca ttt atg ttt ata atc 48
Met Ala His Thr Phe Arg Gly Cys Ser Leu Ala Phe Met Phe Ile Ile
1 5 10 15

acg tgg ctg ttg att aaa gca aaa ata gat gcg tgc aag aga ggc gat 96
Thr Trp Leu Leu Ile Lys Ala Lys Ile Asp Ala Cys Lys Arg Gly Asp
20 25 30

gtg act gtg aag cct tcc cat gta att tta ctt gga tcc act gtc aat 144
Val Thr Val Lys Pro Ser His Val Ile Leu Leu Gly Ser Thr Val Asn

```
        35                  40                  45

att aca tgc tct ttg aag ccc aga caa ggc tgc ttt cac tat tcc aga   192
Ile Thr Cys Ser Leu Lys Pro Arg Gln Gly Cys Phe His Tyr Ser Arg
     50                  55                  60

cgt aac aag tta atc ctg tac aag ttt gac aga aga atc aat ttt cac   240
Arg Asn Lys Leu Ile Leu Tyr Lys Phe Asp Arg Arg Ile Asn Phe His
 65                  70                  75                  80

cat ggc cac tcc ctc aat tct caa gtc aca ggt ctt ccc ctt ggt aca   288
His Gly His Ser Leu Asn Ser Gln Val Thr Gly Leu Pro Leu Gly Thr
                 85                  90                  95

acc ttg ttt gtc tgc aaa ctg gcc tgt atc aat agt gat gaa att caa   336
Thr Leu Phe Val Cys Lys Leu Ala Cys Ile Asn Ser Asp Glu Ile Gln
            100                 105                 110

ata tgt gga gca gag atc ttc gtt ggt gtt gct cca gaa cag cct caa   384
Ile Cys Gly Ala Glu Ile Phe Val Gly Val Ala Pro Glu Gln Pro Gln
        115                 120                 125

aat tta tcc tgc ata cag aag gga gaa cag ggg act gtg gcc tgc acc   432
Asn Leu Ser Cys Ile Gln Lys Gly Glu Gln Gly Thr Val Ala Cys Thr
    130                 135                 140

tgg gaa aga gga cga gac acc cac tta tac act gag tat act cta cag   480
Trp Glu Arg Gly Arg Asp Thr His Leu Tyr Thr Glu Tyr Thr Leu Gln
145                 150                 155                 160

cta agt gga cca aaa aat tta acc tgg cag aag caa tgt aaa gac att   528
Leu Ser Gly Pro Lys Asn Leu Thr Trp Gln Lys Gln Cys Lys Asp Ile
                165                 170                 175

tat tgt gac tat ttg gac ttt gga atc aac ctc acc cct gaa tca cct   576
Tyr Cys Asp Tyr Leu Asp Phe Gly Ile Asn Leu Thr Pro Glu Ser Pro
            180                 185                 190

gaa tcc aat ttc aca gcc aag gtt act gct gtc aat agt ctt gga agc   624
Glu Ser Asn Phe Thr Ala Lys Val Thr Ala Val Asn Ser Leu Gly Ser
        195                 200                 205
```

```
tcc tct tca ctt cca tcc aca ttc aca ttc ttg gac ata gtg agg cct   672
Ser Ser Ser Leu Pro Ser Thr Phe Thr Phe Leu Asp Ile Val Arg Pro
    210                 215                 220

ctt cct ccg tgg gac att aga atc aaa ttt caa aag gct tcc gtg agc   720
Leu Pro Pro Trp Asp Ile Arg Ile Lys Phe Gln Lys Ala Ser Val Ser
225                 230                 235                 240

aga tgt acc ctt tat tgg aga gat gag gga ctg gta ctg ctt aat cga   768
Arg Cys Thr Leu Tyr Trp Arg Asp Glu Gly Leu Val Leu Leu Asn Arg
                245                 250                 255

ctc aga tat cgg ccc agt aac agc agg ctc tgg aat atg gtt aat gtt   816
Leu Arg Tyr Arg Pro Ser Asn Ser Arg Leu Trp Asn Met Val Asn Val
            260                 265                 270

aca aag gcc aaa gga aga cat gat ttg ctg gat ctg aaa cca ttt aca   864
Thr Lys Ala Lys Gly Arg His Asp Leu Leu Asp Leu Lys Pro Phe Thr
        275                 280                 285

gaa tat gaa ttt cag att tcc tct aag cta cat ctt tat aag gga agt   912
Glu Tyr Glu Phe Gln Ile Ser Ser Lys Leu His Leu Tyr Lys Gly Ser
    290                 295                 300

tgg agt gat tgg agt gaa tca ttg aga gca caa aca cca gaa gaa gag   960
Trp Ser Asp Trp Ser Glu Ser Leu Arg Ala Gln Thr Pro Glu Glu Glu
305                 310                 315                 320

cct act ggg atg tta gat gtc tgg tac atg aaa cgg cac att gac tac  1008
Pro Thr Gly Met Leu Asp Val Trp Tyr Met Lys Arg His Ile Asp Tyr
                325                 330                 335

agt aga caa cag att tct ctt ttc tgg aag aat ctg agt gtc tca gag  1056
Ser Arg Gln Gln Ile Ser Leu Phe Trp Lys Asn Leu Ser Val Ser Glu
            340                 345                 350

gca aga gga aaa att ctc cac tat cag gtg acc ttg cag gag ctg aca  1104
Ala Arg Gly Lys Ile Leu His Tyr Gln Val Thr Leu Gln Glu Leu Thr
        355                 360                 365

gga ggg aaa gcc atg aca cag aac atc aca gga cac acc tcc tgg acc  1152
Gly Gly Lys Ala Met Thr Gln Asn Ile Thr Gly His Thr Ser Trp Thr
```

370 375 380

aca gtc att cct aga acc gga aat tgg gct gtg gct gtg tct gca gca 1200
Thr Val Ile Pro Arg Thr Gly Asn Trp Ala Val Ala Val Ser Ala Ala
385 390 395 400

aat tca aaa ggc agt tct ctg ccc act cgt att aac ata atg aac ctg 1248
Asn Ser Lys Gly Ser Ser Leu Pro Thr Arg Ile Asn Ile Met Asn Leu
405 410 415

tgt gag gca ggg ttg ctg gct cct cgc cag gtc tct gca aac tca gag 1296
Cys Glu Ala Gly Leu Leu Ala Pro Arg Gln Val Ser Ala Asn Ser Glu
420 425 430

ggc atg gac aac att ctg gtg act tgg cag cct ccc agg aaa gat ccc 1344
Gly Met Asp Asn Ile Leu Val Thr Trp Gln Pro Pro Arg Lys Asp Pro
435 440 445

tct gct gtt cag gag tac gtg gtg gaa tgg aga gag ctc cat cca ggg 1392
Ser Ala Val Gln Glu Tyr Val Val Glu Trp Arg Glu Leu His Pro Gly
450 455 460

ggt gac aca cag gtc cct cta aac tgg cta cgg agt cga ccc tac aat 1440
Gly Asp Thr Gln Val Pro Leu Asn Trp Leu Arg Ser Arg Pro Tyr Asn
465 470 475 480

gtg tct gct ctg att tca gag aac ata aaa tcc tac atc tgt tat gaa 1488
Val Ser Ala Leu Ile Ser Glu Asn Ile Lys Ser Tyr Ile Cys Tyr Glu
485 490 495

atc cgt gtg tat gca ctc tca ggg gat caa gga gga tgc agc tcc atc 1536
Ile Arg Val Tyr Ala Leu Ser Gly Asp Gln Gly Gly Cys Ser Ser Ile
500 505 510

ctg ggt aac tct aag cac aaa gca cca ctg agt ggc ccc cac att aat 1584
Leu Gly Asn Ser Lys His Lys Ala Pro Leu Ser Gly Pro His Ile Asn
515 520 525

gcc atc aca gag gaa aag ggg agc att tta att tca tgg aac agc att 1632
Ala Ile Thr Glu Glu Lys Gly Ser Ile Leu Ile Ser Trp Asn Ser Ile
530 535 540

```
cca gtc cag gag caa atg ggc tgc ctc ctc cat tat agg ata tac tgg   1680
Pro Val Gln Glu Gln Met Gly Cys Leu Leu His Tyr Arg Ile Tyr Trp
545                 550                 555                 560

aag gaa cgg gac tcc aac tcc cag cct cag ctc tgt gaa att ccc tac   1728
Lys Glu Arg Asp Ser Asn Ser Gln Pro Gln Leu Cys Glu Ile Pro Tyr
                565                 570                 575

aga gtc tcc caa aat tca cat cca ata aac agc ctg cag ccc cga gtg   1776
Arg Val Ser Gln Asn Ser His Pro Ile Asn Ser Leu Gln Pro Arg Val
            580                 585                 590

aca tat gtc ctg tgg atg aca gct ctg aca gct gct ggt gaa agt tcc   1824
Thr Tyr Val Leu Trp Met Thr Ala Leu Thr Ala Ala Gly Glu Ser Ser
        595                 600                 605

cac gga aat gag agg gaa ttt tgt ctg caa ggt aaa gcc aat tgg atg   1872
His Gly Asn Glu Arg Glu Phe Cys Leu Gln Gly Lys Ala Asn Trp Met
    610                 615                 620

gcg ttt gtg gca cca agc att tgc att gct atc atc atg gtg ggc att   1920
Ala Phe Val Ala Pro Ser Ile Cys Ile Ala Ile Ile Met Val Gly Ile
625                 630                 635                 640

ttc tca acg cat tac ttc cag caa aag gtg ttt gtt ctc cta gca gcc   1968
Phe Ser Thr His Tyr Phe Gln Gln Lys Val Phe Val Leu Leu Ala Ala
                645                 650                 655

ctc aga cct cag tgg tgt agc aga gaa att cca gat cca gca aat agc   2016
Leu Arg Pro Gln Trp Cys Ser Arg Glu Ile Pro Asp Pro Ala Asn Ser
            660                 665                 670

act tgc gct aag aaa tat ccc att gca gag gag aag aca cag ctg ccc   2064
Thr Cys Ala Lys Lys Tyr Pro Ile Ala Glu Glu Lys Thr Gln Leu Pro
        675                 680                 685

ttg gac agg ctc ctg ata gac tgg ccc acg cct gaa gat cct gaa ccg   2112
Leu Asp Arg Leu Leu Ile Asp Trp Pro Thr Pro Glu Asp Pro Glu Pro
    690                 695                 700

ctg gtc atc agt gaa gtc ctt cat caa gtg acc cca gtt ttc aga cat   2160
Leu Val Ile Ser Glu Val Leu His Gln Val Thr Pro Val Phe Arg His
```

705 710 715 720

ccc ccc tgc tcc aac tgg cca caa agg gaa aaa gga atc caa ggt cat 2208
Pro Pro Cys Ser Asn Trp Pro Gln Arg Glu Lys Gly Ile Gln Gly His
725 730 735

cag gcc tct gag aaa gac atg atg cac agt gcc tca agc cca cca cct 2256
Gln Ala Ser Glu Lys Asp Met Met His Ser Ala Ser Ser Pro Pro Pro
740 745 750

cca aga gct ctc caa gct gag agc aga caa ctg gtg gat ctg tac aag 2304
Pro Arg Ala Leu Gln Ala Glu Ser Arg Gln Leu Val Asp Leu Tyr Lys
755 760 765

gtg ctg gag agc agg ggc tcc gac cca aag cca gaa aac cca gcc tgt 2352
Val Leu Glu Ser Arg Gly Ser Asp Pro Lys Pro Glu Asn Pro Ala Cys
770 775 780

ccc tgg acg gtg ctc cca gca ggt gac ctt ccc acc cat gat ggc tac 2400
Pro Trp Thr Val Leu Pro Ala Gly Asp Leu Pro Thr His Asp Gly Tyr
785 790 795 800

tta ccc tcc aac ata gat gac ctc ccc tca cat gag gca cct ctc gct 2448
Leu Pro Ser Asn Ile Asp Asp Leu Pro Ser His Glu Ala Pro Leu Ala
805 810 815

gac tct ctg gaa gaa ctg gag cct cag cac atc tcc ctt tct gtt ttc 2496
Asp Ser Leu Glu Glu Leu Glu Pro Gln His Ile Ser Leu Ser Val Phe
820 825 830

ccc tca agt tct ctt cac cca ctc acc ttc tcc tgt ggt gat aag ctg 2544
Pro Ser Ser Ser Leu His Pro Leu Thr Phe Ser Cys Gly Asp Lys Leu
835 840 845

act ctg gat cag tta aag atg agg tgt gac tcc ctc atg ctc tga 2589
Thr Leu Asp Gln Leu Lys Met Arg Cys Asp Ser Leu Met Leu
850 855 860

gtggtgaggc ttcaagcctt aaagtcagtg tgccctcaac cagcacagcc tgccccaatt 2649

cccccagccc ctgctccagc agctgtcatc tctgggtgcc accatcggtc tggctgcagc 2709

tagaggacag gcaagccagc tctgggggag tcttaggaac tgggagttgg tcttcactca 2769

gatgcctcat cttgcctttc ccagggcctt aaaattacat ccttcactgt gtggacctag 2829

agactccaac ttgaattcct agtaactttc ttggtatgct ggccagaaag ggaaatgagg 2889

aggagagtag aaaccacagc tcttagtagt aatggcatac agtctagagg accattcatg 2949

caatgactat ttctaaagca cctgctacac agcaggctgt acacagcaga tcagtactgt 3009

tcaacagaac ttcctgagat gatggaaatg ttctacctct gcactcactg tccagtacat 3069

tagacactag gcacattggc tgttaatcac ttggaatgtg tttagcttga ctgaggaatt 3129

aaattttgat tgtaaattta aatcgccaca catggctagt ggctactgta ttggagtgca 3189

cagctctaga tggctcctag attattgaga gcctccaaaa caaatcaacc tagttctata 3249

gatgaagaca taaaagacac tggtaaacac caatgtaaaa gggcccccaa ggtggtcatg 3309

actggtctca tttgcagaag tctaagaatg taccttttttc tggccgggcg tggtagctca 3369

tgcctgtaat cccagcactt tgggaggctg a 3400

<210> 2
<211> 2036
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1989)

<400> 2
atg gag ccg ctg gtg acc tgg gtg gtc ccc ctc ctc ttc ctc ttc ctg 48
Met Glu Pro Leu Val Thr Trp Val Val Pro Leu Leu Phe Leu Phe Leu
1 5 10 15

ctg tcc agg cag ggc gct gcc tgc aga acc agt gag tgc tgt ttt cag 96
Leu Ser Arg Gln Gly Ala Ala Cys Arg Thr Ser Glu Cys Cys Phe Gln
20 25 30

```
gac ccg cca tat ccg gat gca gac tca ggc tcg gcc tcg ggc cct agg   144
Asp Pro Pro Tyr Pro Asp Ala Asp Ser Gly Ser Ala Ser Gly Pro Arg
         35                  40                  45

gac ctg aga tgc tat cgg ata tcc agt gat cgt tac gag tgc tcc tgg   192
Asp Leu Arg Cys Tyr Arg Ile Ser Ser Asp Arg Tyr Glu Cys Ser Trp
     50                  55                  60

cag tat gag ggt ccc aca gct ggg gtc agc cac ttc ctg cgg tgt tgc   240
Gln Tyr Glu Gly Pro Thr Ala Gly Val Ser His Phe Leu Arg Cys Cys
 65                  70                  75                  80

ctt agc tcc ggg cgc tgc tgc tac ttc gcc gcc ggc tca gcc acc agg   288
Leu Ser Ser Gly Arg Cys Cys Tyr Phe Ala Ala Gly Ser Ala Thr Arg
                 85                  90                  95

ctg cag ttc tcc gac cag gct ggg gtg tct gtg ctg tac act gtc aca   336
Leu Gln Phe Ser Asp Gln Ala Gly Val Ser Val Leu Tyr Thr Val Thr
            100                 105                 110

ctc tgg gtg gaa tcc tgg gcc agg aac cag aca gag aag tct cct gag   384
Leu Trp Val Glu Ser Trp Ala Arg Asn Gln Thr Glu Lys Ser Pro Glu
        115                 120                 125

gtg acc ctg cag ctc tac aac tca gtt aaa tat gag cct cct ctg gga   432
Val Thr Leu Gln Leu Tyr Asn Ser Val Lys Tyr Glu Pro Pro Leu Gly
    130                 135                 140

gac atc aag gtg tcc aag ttg gcc ggg cag ctg cgt atg gag tgg gag   480
Asp Ile Lys Val Ser Lys Leu Ala Gly Gln Leu Arg Met Glu Trp Glu
145                 150                 155                 160

acc ccg gat aac cag gtt ggt gct gag gtg cag ttc cgg cac cgg aca   528
Thr Pro Asp Asn Gln Val Gly Ala Glu Val Gln Phe Arg His Arg Thr
                165                 170                 175

ccc agc agc cca tgg aag ttg ggc gac tgc gga cct cag gat gat gat   576
Pro Ser Ser Pro Trp Lys Leu Gly Asp Cys Gly Pro Gln Asp Asp Asp
            180                 185                 190

act gag tcc tgc ctc tgc ccc ctg gag atg aat gtg gcc cag gaa ttc   624
```

```
Thr Glu Ser Cys Leu Cys Pro Leu Glu Met Asn Val Ala Gln Glu Phe
        195                 200                 205

cag ctc cga cga cgg cag ctg ggg agc caa gga agt tcc tgg agc aag   672
Gln Leu Arg Arg Arg Gln Leu Gly Ser Gln Gly Ser Ser Trp Ser Lys
    210                 215                 220

tgg agc agc ccc gtg tgc gtt ccc cct gaa aac ccc cca cag cct cag   720
Trp Ser Ser Pro Val Cys Val Pro Pro Glu Asn Pro Pro Gln Pro Gln
225                 230                 235                 240

gtg aga ttc tcg gtg gag cag ctg ggc cag gat ggg agg agg cgg ctg   768
Val Arg Phe Ser Val Glu Gln Leu Gly Gln Asp Gly Arg Arg Arg Leu
                245                 250                 255

acc ctg aaa gag cag cca acc cag ctg gag ctt cca gaa ggc tgt caa   816
Thr Leu Lys Glu Gln Pro Thr Gln Leu Glu Leu Pro Glu Gly Cys Gln
            260                 265                 270

ggg ctg gcg cct ggc acg gag gtc act tac cga cta cag ctc cac atg   864
Gly Leu Ala Pro Gly Thr Glu Val Thr Tyr Arg Leu Gln Leu His Met
        275                 280                 285

ctg tcc tgc ccg tgt aag gcc aag gcc acc agg acc ctg cac ctg ggg   912
Leu Ser Cys Pro Cys Lys Ala Lys Ala Thr Arg Thr Leu His Leu Gly
    290                 295                 300

aag atg ccc tat ctc tcg ggt gct gcc tac aac gtg gct gtc atc tcc   960
Lys Met Pro Tyr Leu Ser Gly Ala Ala Tyr Asn Val Ala Val Ile Ser
305                 310                 315                 320

tcg aac caa ttt ggt cct ggc ctg aac cag acg tgg cac att cct gcc   1008
Ser Asn Gln Phe Gly Pro Gly Leu Asn Gln Thr Trp His Ile Pro Ala
                325                 330                 335

gac acc cac aca gaa cca gtg gct ctg aat atc agc gtc gga acc aac   1056
Asp Thr His Thr Glu Pro Val Ala Leu Asn Ile Ser Val Gly Thr Asn
            340                 345                 350

ggg acc acc atg tat tgg cca gcc cgg gct cag agc atg acg tat tgc   1104
Gly Thr Thr Met Tyr Trp Pro Ala Arg Ala Gln Ser Met Thr Tyr Cys
        355                 360                 365
```

```
att gaa tgg cag cct gtg ggc cag gac ggg ggc ctt gcc acc tgc agc   1152
Ile Glu Trp Gln Pro Val Gly Gln Asp Gly Gly Leu Ala Thr Cys Ser
    370                 375                 380

ctg act gcg ccg caa gac ccg gat ccg gct gga atg gca acc tac agc   1200
Leu Thr Ala Pro Gln Asp Pro Asp Pro Ala Gly Met Ala Thr Tyr Ser
385                 390                 395                 400

tgg agt cga gag tct ggg gca atg ggg cag gaa aag tgt tac tac att   1248
Trp Ser Arg Glu Ser Gly Ala Met Gly Gln Glu Lys Cys Tyr Tyr Ile
                405                 410                 415

acc atc ttt gcc tct gcg cac ccc gag aag ctc acc ttg tgg tct acg   1296
Thr Ile Phe Ala Ser Ala His Pro Glu Lys Leu Thr Leu Trp Ser Thr
            420                 425                 430

gtc ctg tcc acc tac cac ttt ggg ggc aat gcc tca gca gct ggg aca   1344
Val Leu Ser Thr Tyr His Phe Gly Gly Asn Ala Ser Ala Ala Gly Thr
        435                 440                 445

ccg cac cac gtc tcg gtg aag aat cat agc ttg gac tct gtg tct gtg   1392
Pro His His Val Ser Val Lys Asn His Ser Leu Asp Ser Val Ser Val
    450                 455                 460

gac tgg gca cca tcc ctg ctg agc acc tgt ccc ggc gtc cta aag gag   1440
Asp Trp Ala Pro Ser Leu Leu Ser Thr Cys Pro Gly Val Leu Lys Glu
465                 470                 475                 480

tat gtt gtc cgc tgc cga gat gaa gac agc aaa cag gtg tca gag cat   1488
Tyr Val Val Arg Cys Arg Asp Glu Asp Ser Lys Gln Val Ser Glu His
                485                 490                 495

ccc gtg cag ccc aca gag acc caa gtt acc ctc agt ggc ctg cgg gct   1536
Pro Val Gln Pro Thr Glu Thr Gln Val Thr Leu Ser Gly Leu Arg Ala
            500                 505                 510

ggt gta gcc tac acg gtg cag gtg cga gca gac aca gcg tgg ctg agg   1584
Gly Val Ala Tyr Thr Val Gln Val Arg Ala Asp Thr Ala Trp Leu Arg
        515                 520                 525

ggt gtc tgg agc cag ccc cag cgc ttc agc atc gaa gtg cag gtt tct   1632
```

```
Gly Val Trp Ser Gln Pro Gln Arg Phe Ser Ile Glu Val Gln Val Ser
    530                 535                 540

gat tgg ctc atc ttc ttc gcc tcc ctg ggg agc ttc ctg agc atc ctt   1680
Asp Trp Leu Ile Phe Phe Ala Ser Leu Gly Ser Phe Leu Ser Ile Leu
545                 550                 555                 560

ctc gtg ggc gtc ctt ggc tac ctt ggc ctg aac agg gcc gca cgg cac   1728
Leu Val Gly Val Leu Gly Tyr Leu Gly Leu Asn Arg Ala Ala Arg His
                565                 570                 575

ctg tgc ccg ccg ctg ccc aca ccc tgt gcc agc tcc gcc att gag ttc   1776
Leu Cys Pro Pro Leu Pro Thr Pro Cys Ala Ser Ser Ala Ile Glu Phe
            580                 585                 590

cct gga ggg aag gag act tgg cag tgg atc aac cca gtg gac ttc cag   1824
Pro Gly Gly Lys Glu Thr Trp Gln Trp Ile Asn Pro Val Asp Phe Gln
        595                 600                 605

gaa gag gca tcc ctg cag gag gcc ctg gtg gta gag atg tcc tgg gac   1872
Glu Glu Ala Ser Leu Gln Glu Ala Leu Val Val Glu Met Ser Trp Asp
    610                 615                 620

aaa ggc gag agg act gag cct ctc gag aag aca gag cta cct gag ggt   1920
Lys Gly Glu Arg Thr Glu Pro Leu Glu Lys Thr Glu Leu Pro Glu Gly
625                 630                 635                 640

gcc cct gag ctg gcc ctg gat aca gag ttg tcc ttg gag gat gga gac   1968
Ala Pro Glu Leu Ala Leu Asp Thr Glu Leu Ser Leu Glu Asp Gly Asp
                645                 650                 655

agg tgc aag gcc aag atg tga tcgttgaggc tcagagaggg tgagtgactc      2019
Arg Cys Lys Ala Lys Met
            660

gcccgaggct acgtagc                                               2036
```

<210> 3
<211> 2016
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1470)

<400> 3

```
atg gct ctc ctc ttt ctc cta ccc ctt gtc atg cag ggt gtg agc agg   48
Met Ala Leu Leu Phe Leu Leu Pro Leu Val Met Gln Gly Val Ser Arg
  1               5                  10                  15

gct gag atg ggc acc gcg gat ctg ggg ccg tcc tca gtg cct aca cca   96
Ala Glu Met Gly Thr Ala Asp Leu Gly Pro Ser Ser Val Pro Thr Pro
             20                  25                  30

act aat gtt aca att gaa tcc tat aac atg aac cct atc gta tat tgg   144
Thr Asn Val Thr Ile Glu Ser Tyr Asn Met Asn Pro Ile Val Tyr Trp
         35                  40                  45

gag tac cag atc atg cca cag gtc cct gtt ttt acc gta gag gta aag   192
Glu Tyr Gln Ile Met Pro Gln Val Pro Val Phe Thr Val Glu Val Lys
     50                  55                  60

aac tat ggt gtt aag aat tca gaa tgg att gat gcc tgc atc aat att   240
Asn Tyr Gly Val Lys Asn Ser Glu Trp Ile Asp Ala Cys Ile Asn Ile
 65                  70                  75                  80

tct cat cat tat tgt aat att tct gat cat gtt ggt gat cca tca aat   288
Ser His His Tyr Cys Asn Ile Ser Asp His Val Gly Asp Pro Ser Asn
                 85                  90                  95

tct ctt tgg gtc aga gtt aaa gcc agg gtt gga caa aaa gaa tct gcc   336
Ser Leu Trp Val Arg Val Lys Ala Arg Val Gly Gln Lys Glu Ser Ala
            100                 105                 110

tat gca aag tca gaa gaa ttt gct gta tgc cga gat gga aaa att gga   384
Tyr Ala Lys Ser Glu Glu Phe Ala Val Cys Arg Asp Gly Lys Ile Gly
        115                 120                 125

cca cct aaa ctg gat atc aga aag gag gag aag caa atc atg att gac   432
Pro Pro Lys Leu Asp Ile Arg Lys Glu Glu Lys Gln Ile Met Ile Asp
    130                 135                 140
```

```
ata ttt cac cct tca gtt ttt gta aat gga gac gag cag gaa gtc gat   480
Ile Phe His Pro Ser Val Phe Val Asn Gly Asp Glu Gln Glu Val Asp
145                 150                 155                 160

tat gat ccc gaa act acc tgt tac att agg gtg tac aat gtg tat gtg   528
Tyr Asp Pro Glu Thr Thr Cys Tyr Ile Arg Val Tyr Asn Val Tyr Val
                165                 170                 175

aga atg aac gga agt gag atc cag tat aaa ata ctc acg cag aag gaa   576
Arg Met Asn Gly Ser Glu Ile Gln Tyr Lys Ile Leu Thr Gln Lys Glu
            180                 185                 190

gat gat tgt gac gag att cag tgc cag tta gcg att cca gta tcc tca   624
Asp Asp Cys Asp Glu Ile Gln Cys Gln Leu Ala Ile Pro Val Ser Ser
        195                 200                 205

ctg aat tct cag tac tgt gtt tca gca gaa gga gtc tta cat gtg tgg   672
Leu Asn Ser Gln Tyr Cys Val Ser Ala Glu Gly Val Leu His Val Trp
    210                 215                 220

ggt gtt aca act gaa aag tca aaa gaa gtt tgt att acc att ttc aat   720
Gly Val Thr Thr Glu Lys Ser Lys Glu Val Cys Ile Thr Ile Phe Asn
225                 230                 235                 240

agc agt ata aaa ggt tct ctt tgg att cca gtt gtt gct gct tta cta   768
Ser Ser Ile Lys Gly Ser Leu Trp Ile Pro Val Val Ala Ala Leu Leu
                245                 250                 255

ctc ttt cta gtg ctt agc ctg gta ttc atc tgt ttt tat att aag aaa   816
Leu Phe Leu Val Leu Ser Leu Val Phe Ile Cys Phe Tyr Ile Lys Lys
            260                 265                 270

att aat cca ttg aag gaa aaa agc ata ata tta ccc aag tcc ttg atc   864
Ile Asn Pro Leu Lys Glu Lys Ser Ile Ile Leu Pro Lys Ser Leu Ile
        275                 280                 285

tct gtg gta aga agt gct act tta gag aca aaa cct gaa tca aaa tat   912
Ser Val Val Arg Ser Ala Thr Leu Glu Thr Lys Pro Glu Ser Lys Tyr
    290                 295                 300

gta tca ctc atc acg tca tac cag cca ttt tcc tta gaa aag gag gtg   960
Val Ser Leu Ile Thr Ser Tyr Gln Pro Phe Ser Leu Glu Lys Glu Val
```

305 310 315 320

gtc tgt gaa gag ccg ttg tct cca gca aca gtt cca ggc atg cat acc 1008
Val Cys Glu Glu Pro Leu Ser Pro Ala Thr Val Pro Gly Met His Thr
325 330 335

gaa gac aat cca gga aaa gtg gaa cat aca gaa gaa ctt tct agt ata 1056
Glu Asp Asn Pro Gly Lys Val Glu His Thr Glu Glu Leu Ser Ser Ile
340 345 350

aca gaa gtg gtg act act gaa gaa aat att cct gac gtg gtc ccg ggc 1104
Thr Glu Val Val Thr Thr Glu Glu Asn Ile Pro Asp Val Val Pro Gly
355 360 365

agc cat ctg act cca ata gag aga gag agt tct tca cct tta agt agt 1152
Ser His Leu Thr Pro Ile Glu Arg Glu Ser Ser Ser Pro Leu Ser Ser
370 375 380

aac cag tct gaa cct ggc agc atc gct tta aac tcg tat cac tcc aga 1200
Asn Gln Ser Glu Pro Gly Ser Ile Ala Leu Asn Ser Tyr His Ser Arg
385 390 395 400

aat tgt tct gag agt gat cac tcc aga aat ggt ttt gat act gat tcc 1248
Asn Cys Ser Glu Ser Asp His Ser Arg Asn Gly Phe Asp Thr Asp Ser
405 410 415

agc tgt ctg gaa tca cat agc tcc tta tct gac tca gaa ttt ccc cca 1296
Ser Cys Leu Glu Ser His Ser Ser Leu Ser Asp Ser Glu Phe Pro Pro
420 425 430

aat aat aaa ggt gaa ata aaa aca gaa gga caa gag ctc ata acc gta 1344
Asn Asn Lys Gly Glu Ile Lys Thr Glu Gly Gln Glu Leu Ile Thr Val
435 440 445

ata aaa gcc ccc acc tcc ttt ggt tat gat aaa cca cat gtg cta gtg 1392
Ile Lys Ala Pro Thr Ser Phe Gly Tyr Asp Lys Pro His Val Leu Val
450 455 460

gat cta ctt gtg gat gat agc ggt aaa gag tcc ttg att ggt tat aga 1440
Asp Leu Leu Val Asp Asp Ser Gly Lys Glu Ser Leu Ile Gly Tyr Arg
465 470 475 480

cca aca gaa gat tcc aaa gaa ttt tca tga gatcagctaa gttgcaccaa 1490
Pro Thr Glu Asp Ser Lys Glu Phe Ser
485 490

ctttgaagtc tgattttcct ggacagtttt ctgctttaat ttcatgaaaa gattatgatc 1550

tcagaaattg tatcttagtt ggtatcaacc aaatggagtg acttagtgta catgaaagcg 1610

taaagaggat gtgtggcatt ttcacttttg gcttgtaaag tacagacttt ttttttttt 1670

taaacaaaaa aagcattgta acttatgaac ctttacatcc agataggtta ccagtaacgg 1730

aacatatcca gtactcctgg ttcctaggtg agcaggtgat gccccaggga cctttgtagc 1790

cacttcactt tttttctttt ctctgccttg gtatagcata tgtgttttgt aagtttatgc 1850

atacagtaat tttaagtaat ttcagaagaa attctcgaag cttttcaaaa ttggacttaa 1910

aatctaattc aaactaatag aattaatgga atatgtaaat agaaacgtgt atatttttta 1970

tgaaacatta cagttagaga tttttaaata aagaatttta aaactc 2016

<210> 4
<211> 3498
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1626)

<400> 4
atg aat tgt aga gaa tta ccc ttg acc ctt tgg gtg ctt ata tct gta 48
Met Asn Cys Arg Glu Leu Pro Leu Thr Leu Trp Val Leu Ile Ser Val
1 5 10 15

agc act gca gaa tct tgt act tca cgt ccc cac att act gtg gtt gaa 96
Ser Thr Ala Glu Ser Cys Thr Ser Arg Pro His Ile Thr Val Val Glu
20 25 30

ggg gaa cct ttc tat ctg aaa cat tgc tcg tgt tca ctt gca cat gag 144

```
Gly Glu Pro Phe Tyr Leu Lys His Cys Ser Cys Ser Leu Ala His Glu
         35                  40                  45

att gaa aca acc acc aaa agc tgg tac aaa agc agt gga tca cag gaa   192
Ile Glu Thr Thr Thr Lys Ser Trp Tyr Lys Ser Ser Gly Ser Gln Glu
     50                  55                  60

cat gtg gag ctg aac cca agg agt tcc tcg aga att gct ttg cat gat   240
His Val Glu Leu Asn Pro Arg Ser Ser Ser Arg Ile Ala Leu His Asp
 65                  70                  75                  80

tgt gtt ttg gag ttt tgg cca gtt gag ttg aat gac aca gga tct tac   288
Cys Val Leu Glu Phe Trp Pro Val Glu Leu Asn Asp Thr Gly Ser Tyr
                 85                  90                  95

ttt ttc caa atg aaa aat tat act cag aaa tgg aaa tta aat gtc atc   336
Phe Phe Gln Met Lys Asn Tyr Thr Gln Lys Trp Lys Leu Asn Val Ile
            100                 105                 110

aga aga aat aaa cac agc tgt ttc act gaa aga caa gta act agt aaa   384
Arg Arg Asn Lys His Ser Cys Phe Thr Glu Arg Gln Val Thr Ser Lys
        115                 120                 125

att gtg gaa gtt aaa aaa ttt ttt cag ata acc tgt gaa aac agt tac   432
Ile Val Glu Val Lys Lys Phe Phe Gln Ile Thr Cys Glu Asn Ser Tyr
    130                 135                 140

tat caa aca ctg gtc aac agc aca tca ttg tat aag aac tgt aaa aag   480
Tyr Gln Thr Leu Val Asn Ser Thr Ser Leu Tyr Lys Asn Cys Lys Lys
145                 150                 155                 160

cta cta ctg gag aac aat aaa aac cca acg ata aag aag aac gcc gag   528
Leu Leu Leu Glu Asn Asn Lys Asn Pro Thr Ile Lys Lys Asn Ala Glu
                165                 170                 175

ttt gaa gat cag ggg tat tac tcc tgc gtg cat ttc ctt cat cat aat   576
Phe Glu Asp Gln Gly Tyr Tyr Ser Cys Val His Phe Leu His His Asn
            180                 185                 190

gga aaa cta ttt aat atc acc aaa acc ttc aat ata aca ata gtg gaa   624
Gly Lys Leu Phe Asn Ile Thr Lys Thr Phe Asn Ile Thr Ile Val Glu
        195                 200                 205
```

```
gat cgc agt aat ata gtt ccg gtt ctt ctt gga cca aag ctt aac cat   672
Asp Arg Ser Asn Ile Val Pro Val Leu Leu Gly Pro Lys Leu Asn His
    210                 215                 220

gtt gca gtg gaa tta gga aaa aac gta agg ctc aac tgc tct gct ttg   720
Val Ala Val Glu Leu Gly Lys Asn Val Arg Leu Asn Cys Ser Ala Leu
225                 230                 235                 240

ctg aat gaa gag gat gta att tat tgg atg ttc ggg gaa gaa aat gga   768
Leu Asn Glu Glu Asp Val Ile Tyr Trp Met Phe Gly Glu Glu Asn Gly
                245                 250                 255

tcg gat cct aat ata cat gaa gag aaa gaa atg aga att atg act cca   816
Ser Asp Pro Asn Ile His Glu Glu Lys Glu Met Arg Ile Met Thr Pro
            260                 265                 270

gaa ggc aaa tgg cat gct tca aaa gta ttg aga att gaa aat att ggt   864
Glu Gly Lys Trp His Ala Ser Lys Val Leu Arg Ile Glu Asn Ile Gly
        275                 280                 285

gaa agc aat cta aat gtt tta tat aat tgc act gtg gcc agc acg gga   912
Glu Ser Asn Leu Asn Val Leu Tyr Asn Cys Thr Val Ala Ser Thr Gly
    290                 295                 300

ggc aca gac acc aaa agc ttc atc ttg gtg aga aaa gca gac atg gct   960
Gly Thr Asp Thr Lys Ser Phe Ile Leu Val Arg Lys Ala Asp Met Ala
305                 310                 315                 320

gat atc cca ggc cac gtc ttc aca aga gga atg atc ata gct gtt ttg   1008
Asp Ile Pro Gly His Val Phe Thr Arg Gly Met Ile Ile Ala Val Leu
                325                 330                 335

atc ttg gtg gca gta gtg tgc cta gtg act gtg tgt gtc att tat aga   1056
Ile Leu Val Ala Val Val Cys Leu Val Thr Val Cys Val Ile Tyr Arg
            340                 345                 350

gtt gac ttg gtt cta ttt tat aga cat tta acg aga aga gat gaa aca   1104
Val Asp Leu Val Leu Phe Tyr Arg His Leu Thr Arg Arg Asp Glu Thr
        355                 360                 365

tta aca gat gga aaa aca tat gat gct ttt gtg tct tac cta aaa gaa   1152
```

```
Leu Thr Asp Gly Lys Thr Tyr Asp Ala Phe Val Ser Tyr Leu Lys Glu
    370                 375                 380

tgc cga cct gaa aat gga gag gag cac acc ttt gct gtg gag att ttg   1200
Cys Arg Pro Glu Asn Gly Glu Glu His Thr Phe Ala Val Glu Ile Leu
385                 390                 395                 400

ccc agg gtg ttg gag aaa cat ttt ggg tat aag tta tgc ata ttt gaa   1248
Pro Arg Val Leu Glu Lys His Phe Gly Tyr Lys Leu Cys Ile Phe Glu
                405                 410                 415

agg gat gta gtg cct gga gga gct gtt gtt gat gaa atc cac tca ctg   1296
Arg Asp Val Val Pro Gly Gly Ala Val Val Asp Glu Ile His Ser Leu
            420                 425                 430

ata gag aaa agc cga aga cta atc att gtc cta agt aaa agt tat atg   1344
Ile Glu Lys Ser Arg Arg Leu Ile Ile Val Leu Ser Lys Ser Tyr Met
        435                 440                 445

tct aat gag gtc agg tat gaa ctt gaa agt gga ctc cat gaa gca ttg   1392
Ser Asn Glu Val Arg Tyr Glu Leu Glu Ser Gly Leu His Glu Ala Leu
    450                 455                 460

gtg gaa aga aaa att aaa ata atc tta att gaa ttt aca cct gtt act   1440
Val Glu Arg Lys Ile Lys Ile Ile Leu Ile Glu Phe Thr Pro Val Thr
465                 470                 475                 480

gac ttc aca ttc ttg ccc caa tca cta aag ctt ttg aaa tct cac aga   1488
Asp Phe Thr Phe Leu Pro Gln Ser Leu Lys Leu Leu Lys Ser His Arg
                485                 490                 495

gtt ctg aag tgg aag gcc gat aaa tct ctt tct tat aac tca agg ttc   1536
Val Leu Lys Trp Lys Ala Asp Lys Ser Leu Ser Tyr Asn Ser Arg Phe
            500                 505                 510

tgg aag aac ctt ctt tac tta atg cct gca aaa aca gtc aag cca ggt   1584
Trp Lys Asn Leu Leu Tyr Leu Met Pro Ala Lys Thr Val Lys Pro Gly
        515                 520                 525

aga gac gaa ccg gaa gtc ttg cct gtt ctt tcc gag tct taa           1626
Arg Asp Glu Pro Glu Val Leu Pro Val Leu Ser Glu Ser
    530                 535                 540
```

tcttcagaaa cagtgaacgc caaaaagaac tcaagatatt ctggggactg agcatatgaa 1686

cctgttcata acaaaggctg tgactcgaaa taattaactt tgtcaaaatc ctgctcacaa 1746

tttgaagatg aaacttgtca ttaggttggc gggaatgaga ctaaagattg cgctgtgggc 1806

tgtggtcacg tgctcccaga agacctggaa ttcaaaagaa atggagctat tctttttctc 1866

cctctttcat aactggatgc agctgctcat actcaatccc atattcagca agtgtgaagc 1926

tggacgtgat gcaaaataac cgatgcccta caaaaagggc gcatctttaa gagttttaat 1986

gccagtgctt aattcgaatg aggggatttt aagtgtctga agaggcattt tctagggacc 2046

agtgggtgac tgagtaactg aaatgctgct ttcactccct aacaccatgg atctggttgt 2106

gcataggatg tgggaggagg ggctggcagg gccgccttca gaggctgcag ggcctcagcc 2166

tcaggatgca tttaatgtat cctggccaca gttgcagcca acggttcttg aaagctcggt 2226

aaggccctgc aacgcagagc ctgcttatgt ggatctattt atgggaactt cttaaaagga 2286

ccccagaata gctctttatc tttcacaaga gacacaaatt ctaattgagt taattatctg 2346

ggcctttcac tttggatgct ctgaaacatt tgttgatttt gtgtgaatgt ttatatcaaa 2406

atgtttgcca ggttgtatta gccattgaat agcaaaaaac tgatagttac ttgcttgttt 2466

tttaaaaatt acatattaaa aatgcccttg gcataaggca gcatggtgtg gcagttaaga 2526

gatgggctgt gcagcccatc ctgagctcca gtcctgagtt tgctacttac ttctgtggcc 2586

tctggaacct tatccaacct cttggtgctt cagtttcctc atctgtgaaa ttagaattta 2646

taataattgc acctacctcc caggggtaac taaatgaata aatataataa agtacttaca 2706

gtggttcctg acacagactc agcactccgt cagtgttgcc atgactattt ttattatcat 2766

tattaatgat tacttagatc aattatttag cagtggacta atggaagcta cagagcaggg 2826

aagggaagca gatctaggga ggaaggcagt tttgatttga ggaggtttgc acatgtagag 2886

aagcatactg gagaagcata tccagagggc gaaagatatc tctccattgt gcatctgcct 2946

cttttgacgt tggaagacac atgtcttact ccccaaaggg agcccagcac tgggagcctt 3006

cttgatgatc tcaaaaataa tagctattca agaaaatcac caagtgactg tgaaaccgtc 3066

agttcggaag gctggttaga acatgtggga gcaacatgaa tgttctacaa aagtttaaag 3126

cagagattgt ttcaaatggg tgtagtagat attactgaaa accaaaaaag agtgagattg 3186

tcagtgtaag aatgtgattt aatgtttgta gtgcttacaa ttttgtgtac caactggatg 3246

actaaaaaga gtaaaataac ttaattaata gctcatattt tatgtgtgaa aacatgttag 3306

tgaacatata taatcaaaat agatttcatt gctattgcat agtctctaat acatagaatg 3366

attttgcttt tctcttttat tatacttgct ttaaaatact tgaaatatat tttgcattaa 3426

atgcatttca agttaaatgt cttaaatgta tacattagat gtgtgtttta aaatgcataa 3486

aacacgttga aa 3498

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
ctcctcgaac caatttggtc 20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6
ctgcacttcg atgctgaagc 20

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
cggagttcta taccagagtt g 21

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
acatctaaca tcccagtagg c 21

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9
gatgacagct ctgacagctg 20

<210> 10
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 10
ggcctgatga ccttggatt 19

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 11

ctgctctgct ttgctgaatg 20

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 12
tcctcttgtg aagacgtggc 20

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 13
cgtcatacca gccattttcc 20

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 14
ttggtgcaac ttagctgatc 20

<210> 15
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 15
ggcttaaagg ggccaagt 18

<210> 16
<211> 20
<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16
agggagcact atccctcagc 20

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 17
gtccagagac atgtaagtgc 20

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 18
gagatgatgc ttgtcaacca 20

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 19
gctagaaaga tgaaagctgg 20

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 20
gtttctgatt ctggcaactg 20

特許協力条約に基づく国際出願願書
原本（出願用）- 印刷日時 2003年08月29日 (29.08.2003) 金曜日 13時54分49秒

VIII-5-1	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て（規則4.17(v)及び51の2.1(a)(v)）	本国際出願に関し、 株式会社　ビー・エム・エルは、 本国際出願の請求項に記載された対象が以下のように開示されたことを申し立てる。
VIII-5-1 (i)	開示の種類	刊行物
VIII-5-1 (ii)	開示の日付:	
VIII-5-1 (iii)	開示の名称:	THE JOURNAL OF Allergy AND Clinical Immunology
VIII-5-1 (iv)	開示の場所:	VOLUME 109 No. 4 APRIL 2002 pp. 669-675
VIII-5-1 (v)	本申立ては、次の指定国のためになされたものである。:	すべての指定国

特許協力条約に基づく国際出願願書
原本（出願用）- 印刷日時 2003年08月29日 (29.08.2003) 金曜日 13時54分49秒

VIII-5-2	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て（規則4.17(v)及び51の2.1(a)(v)）	本国際出願に関し、 近藤 直実は、 本国際出願の請求項に記載された対象が以下のように開示されたことを申し立てる。
VIII-5-2 (i)	開示の種類	刊行物
VIII-5-2 (ii)	開示の日付:	
VIII-5-2 (iii)	開示の名称:	THE JOURNAL OF Allergy AND Clinical Immunology
VIII-5-2 (iv)	開示の場所:	VOLUME 109 No. 4 APRIL 2002 pp. 669-675
VIII-5-2 (v)	本申立ては、次の指定国のためになされたものである。:	すべての指定国

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/11118

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] C12N15/12, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl[7] C12N15/12, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), REGISTRY(STN), CA(STN), JSTPlus(JOIS), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Francesca F. et al., Individuation of new single nucleotide polymorphisms (cSNPs) in the inter leukin-12 receptor beta2 chain gene (IL-12Rbeta2) in the children with elevated serum IgE levels., Blood, 2001, Vol.98, No.11, part 1, p.506a	1,2,17-19
A	Francesca F. et al., Identification of a new mutation in the interleukin-12 receptor beta1 chain gene(IL-2Rβ1) in a patient with recurrent broncopneumonia., Blood, 2001, Vol.98, No.11, part 1, p.505a	1,2,17-19
A	WO 02/57414 A2 (Biocardia, Inc.), 25 July, 2002 (25.07.02), & WO 02/57414 A3	1,2,17-19

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [] See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 November, 2003 (26.11.03)	09 December, 2003 (09.12.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/11118

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Gao PS et al., Nonpathogenic common variants of IFNGR1 and IFNGR2 in association with total serum IgE levels., Biochem.Biophys.Res.Commun., 1999, Vol.263, No.2, p.425-9	1,2,17-19
A	Hackstein H. et al., Definition of human interleukin-4 receptor alpha chain haplotypes and allelic association with atopy markers, Hum. Immunol., 1999, Vol.60, No.11, p.1119-27	1,2,17-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/11118

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Inventions as claimed claims 1, 2 and 17 to 19 relating to a polymorphism at the site encoding arginine at the 313-position of interleukin 12 receptor β2 chain protein.

Remark on Protest
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

Concerning the method of detecting an allergen of a subject by detecting gene polymorphisms in interleukin 12 receptor, interleukin 18 receptor, interferon γ receptor and interleukin 12·p40 subunit shown by 1 to 13 as set forth in claim 1, there are common chemical structures for respective cytokine receptors or cytokines of 1 to 13 and the matter common to the whole claim resides exclusively in detecting an allergen of a subject by detecting polymorphisms in cytokine receptors or cytokines.

However, the following document 1 reports a method of detecting an allergen of a subject by detecting a polymorphism in IL-12 receptor β2 chain which is a cytokine receptor, the following document 2 reports a method of detecting an allergen of a subject by detecting a polymorphism in interferon γ receptor β2, and the following document 3 reports a method of detecting an allergen of a subject by detecting a polymorphism in IL-4 receptor which is a cytokine receptor. Thus, the above-described technique cannot be considered as a special technical feature in the meaning within PCT Rule 13.2.

Such being the case, the inventions relating to the detection of polymorphisms shown by 1 to 13, among the inventions as claimed in claim 1, are not considered as a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept. Although the detection of polymorphisms in IL-12 receptor β (5 to 7) and IL-12·p40 subunit (10 to 13) respectively comply with the requirement of unity of invention, others cannot be regarded as a group of inventions (since the detection of a gene polymorphism in IL-12 receptor β2 chain had been known). Namely, it appears that there are 8 groups of inventions different from each other.

Document

1. Francesca F et al, Individuation of new single nucleotide polymorphisms (cSNPs) in the interleukin-12 receptor beta 2 gene (IL-12Rbeta2) in the children with elevated serum IgE levels., Blood, Vol.98, No.11, part 1, p.506a

2. Gao PS et al, Nonpathogenic common variants of IFNGR1 and IFNGR2 in association with total serum IgE levels., Biochem Biophys Res Commun., 1999, Vo.263, NO.2, p.425-429.

3. Hackstein H et al, Definition of human interleukin-4 receptor alpha chain haplotypes and allelic association with atopy markers., Hum Immunol., 1999, Vol.60, No.11, P.1119-1127.

国際調査報告

国際出願番号　PCT／JP03／11118

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
Int Cl' C12N15/12, C12Q1/68

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））
Int Cl' C12N15/12, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
BIOSIS（DIALOG），WPI（DIALOG），REGISTRY（STN），CA（STN），
JSTPlus（JOIS），GenBank／EMBL／DDBJ／GeneSeq

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
A	Francesca F et al, Individuation of new single nucleotide polymorphisms (cSNPs) in the interleukin-12 receptor beta2 chain gene(IL-12Rbeta2) in the children with elevated serum IgE levels., Blood, 2001, Vol. 98, No. 11 part1, p. 506a	1, 2, 17-19
A	Francesca F et al, Identification of a new mutation in the interleukin-12 receptor beta1 chain gene(IL-12Rβ1) in a patient with recurrent broncopneumonia., Blood, 2001, Vol. 98, No. 11 part1, p. 505a	1, 2, 17-19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日　26. 11. 03	国際調査報告の発送日　09.12.03
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA／JP） 郵便番号100－8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員）　六笠　紀子　印　4B　9735 電話番号　03－3581－1101　内線　3448

様式PCT／ISA／210（第2ページ）（1998年7月）

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
A	WO 02/57414 A2(Biocardia, Inc.)2002.07.25 & WO 02/57414 A3	1, 2, 17-19
A	Gao PS et al, Nonpathogenic common variants of *IFNGR1* and *IFNGR2* in association with total serum IgE levels., Biochem Biophys Res Commun., 1999, Vol. 263, No. 2, p. 425-9.	1, 2, 17-19
A	Hackstein H et al, Definition of human interleukin-4 receptor alpha chain haplotypes and allelic association with atopy markers., Hum Immunol., 1999, Vol. 60, No. 11, p. 1119-27.	1, 2, 17-19

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ０３／１１１１８

第Ⅰ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第８条第３項（ＰＣＴ１７条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1．☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

2．☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3．☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第３文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

別紙参照。

1．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4．☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲　１，２，１７－１９のインターロイキン１２レセプターβ２鎖タンパク質の３１３番目のアルギニンをコードする部位の遺伝子多型に関する発明

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第ＩＩ欄　続き

請求の範囲１に記載された１乃至１３に示されたインターロイキン１２レセプター、インターロイキン１８レセプター、インターフェロンγレセプター、インターロイキン１２・ｐ４０サブユニットの遺伝子多型を検出することにより、被験者のアレルギー素因を検出する方法について、１乃至１３はそれぞれのサイトカインレセプターあるいはサイトカイン毎でのみ共通の化学構造を有するものであり、全体ではサイトカインレセプターあるいはサイトカインの遺伝子多型を検出することで被験者のアレルギー素因を検出することにおいてのみ共通する。

しかし、下記文献１にはサイトカインレセプターであるＩＬ－１２レセプターβ２鎖の遺伝子多型を検出することにより被験者のアレルギー素因を検出する方法が記載され、文献２にはインターフェロンγレセプターの遺伝子多型を検出することにより被験者のアレルギー素因を検出する方法が、文献３にはサイトカインレセプターであるＩＬ－４レセプターの遺伝子多型を検出することにより被験者のアレルギー素因を検出する方法が記載されているので、上記の技術はＰＣＴ規則１３．２における特別な技術的特徴であるとはいえない。

よって、請求の範囲１に記載された発明のうち、１乃至１３に示された多型を検出することは単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえず、５乃至７のＩＬ－１２レセプターβ１、１０乃至１３のＩＬ－１２・ｐ４０サブユニットの遺伝子多型を検出することはそれぞれ発明の単一性を満たすものの、これ以外については（ＩＬ－１２レセプターβ２鎖の遺伝子多型を検出することも知られているので）一群の発明とは認められず、８個の異なる発明からなるものと認める。

文献

１．Francesca F et al, Individuation of new single nucleotide polymorphisms (cSNPs) in the interleukin-12 receptor beta2 chain gene(IL-12Rbeta2) in the children with elevated serum IgE levels., Blood , Vol. 98, No. 11 part1, p. 506a

２．Gao PS et al, Nonpathogenic common variants of IFNGR1 and IFNGR2 in association with total serum IgE levels., Biochem Biophys Res Commun., 1999, Vol. 263, No. 2, p. 425-429.

３．Hackstein H et al, Definition of human interleukin-4 receptor alpha chain haplotypes and allelic association with atopy markers., Hum Immunol., 1999, Vol. 60, No. 11, p. 1119-1127.